



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

**DETERMINACIÓN DE INDICADORES GENÉTICOS Y MOLECULARES
DE LA APTITUD GERMINATIVA DE SEMILLAS DE MAÍZ**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

P R E S E N T A

DAGOBERTO DURÁN HERNÁNDEZ

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. MARINA OLIVIA FRANCO HERNÁNDEZ

DR. GERMÁN FERNANDO GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F

JULIO 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 15 del mes de junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:

Determinación de indicadores genéticos y moleculares de la aptitud germinativa de semillas de maíz

Presentada por el alumno:

Durán

Apellido paterno

Hernández

Apellido materno

Dagoberto

Nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	9	1	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: Doctorado en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Marina Olvera Franco Hernández

Germán D. Gutiérrez A.

DRA. MARIA GUADALUPE RAMIREZ SOTELO

Dr. Luis Fernando López

Dr. Jesús Agustín Bucalita Carona



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de México, D.F., el día 15 del mes de Junio del año 2011, el que suscribe M. en C. Dagoberto Durán Hernández alumno de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos con número de registro A080913, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la Dirección de la Dra. Marina Olivia Franco Hernández y del Dr. Germán Fernando Gutiérrez Hernández y cede los derechos del trabajo intitulado "Determinación de indicadores genéticos y moleculares de la aptitud germinativa de semillas de maíz", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección durand78@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Dagoberto Durán Hernández
Nombre y firma

Declaración de originalidad

“Yo Dagoberto Durán Hernández declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi director de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”

RESUMEN

El envejecimiento de las semillas es producto de una serie de eventos degenerativos no regulados, que se manifiestan a diversos niveles: molecular, bioquímico y fisiológico, los cuales merman la calidad seminal y culminan con la pérdida de su viabilidad. El objetivo del presente estudio fue identificar proteínas del ciclo celular que sirvieran como marcadores bioquímicos en respuesta a condiciones extremas de temperatura y humedad a las que se expusieron las semillas y correlacionar este comportamiento con datos fisiológicos. Se emplearon 3 genotipos diferentes de maíz y se aplicaron dos tipos de envejecimiento artificial: Calor seco (60°C, 48 h) y Calor húmedo (41°C, 100% HR, 72 h).

El daño ocasionado por el deterioro llevó a una acumulación diferencial de las proteínas del ciclo celular, según el genotipo de la semilla y el tratamiento aplicado. Por lo anterior, se deduce que los efectos causados por el envejecimiento artificial son consistentes y confiables para estudios bioquímicos y moleculares sobre la longevidad de semillas, además de que su intensidad está determinada por el genotipo de las mismas. Los marcadores asociados al vigor y/o a la tolerancia al envejecimiento natural o artificial de las semillas, derivados del escrutinio del ciclo celular, pudieran utilizarse en los programas oficiales de mejoramiento genético de maíz, para formar variedades de características sobresalientes, en este caso para exhibir mayores niveles de vigor y de longevidad, elementos primordiales para su manejo en los bancos de germoplasma.

ABSTRACT

The aging of the seeds is product of a series of not regulated degenerative events that are pronounced at diverse levels: molecular, biochemical and physiological, which decrease the seminal quality and culminate with the loss of their viability. The objective of the present study was to identify proteins of the cellular cycle that served like biochemical markers in response to extreme conditions of temperature and humidity to which the seeds were exposed and to correlate this behavior with physiological datas. 3 different genotypes from maize were used and two types of artificial aging were applied: Dry heat (60°C, 48 h) and humid heat (41°C, 100% HR, 72 h).

The damage caused by the deterioration took to an accumulation differential of proteins of the cellular cycle, according to the genotype of the seed and the applied treatment. By the previous thing, it is deduced that the effects caused by the artificial aging are consistent and reliable for biochemical and molecular studies on the longevity of seeds, apart from which its intensity is determined by the genotype of the same. The markers associated to the vigor and/or the tolerance to the natural or artificial aging of the seeds, derivatives of the scrutiny of the cellular cycle, could be used in the official programs of genetic maize improvement, to form varieties of excellent characteristics, in this case to exhibit majors longevity and vigor levels, fundamental elements for their handling in the germplasm banks.

Este trabajo de investigación se realizó gracias al apoyo financiero del Programa de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional.

Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) del Instituto Politécnico Nacional y en el Laboratorio 114 de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

Aprovecho este espacio para agradecer de la manera más humilde a todas aquellas personas que estuvieron involucradas en esta etapa tan significativa para mí.

Mi eterna gratitud al Instituto Politécnico Nacional y a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, por permitirme ser parte de esta gloriosa institución.

Mi más sincera gratitud al Dr. Germán F. Gutiérrez Hernández codirector de esta tesis, por depositar su confianza en mí para la realización de este proyecto que implica grandes cosas. Gracias por el apoyo brindado, por los consejos y regañones, los cuales me forjaron para ser mejor persona. Mi respeto y mi estimación para usted.

Asimismo doy las gracias a la Dra. Marina Olivia Franco Hernández, codirectora de esta tesis, agradezco sus consejos y su paciencia, su apoyo incondicional y su disposición en todo momento para que este trabajo culminara en buen término.

Al Dr. José Luis Arellano Vázquez, miembro del Programa de Mejoramiento Genético de Maíz del Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por su valiosa aportación de germoplasma de maíz azul.

Expreso mi agradecimiento al comité evaluador, Dra. Guadalupe Ramírez Sotelo, Dr., Luis Fernández Linares y al Dr. Agustín Badillo Corona por las observaciones a este trabajo por los acertados comentarios para mejorar este documento y el tiempo dedicado a la revisión del mismo.

También agradezco profundamente al Dr. Jorge M. Vázquez Ramos, por todos sus comentarios y observaciones para la realización de este trabajo, por abrirme las puertas de su laboratorio y por el gran apoyo que siempre me brinda. Un gran ser humano al que tuve la oportunidad de conocer.

Al Dr. Elpidio García Ramírez por su invaluable ayuda técnica e intelectual, por sus consejos y críticas profundas, por su paciencia y por los gratos momentos que pasamos. Gracias Pilo!

Como olvidar a todas las personas que he conocido a lo largo de este tiempo en el Lab 114, a Silvia Karina un agradecimiento especial por su invaluable ayuda, a Sara, Yaddith, Ilenia, Carlos, Enrique, Manuel, Tavo, Miguel, Paco, Víctor, Jorge, Mingyar, Jorge Zamora, gracias por todos los momentos compartidos.

A los compañeros del Posgrado; Pilar, Diana, Iliana, Paola, Karina, Axa, Rubén por el tiempo compartido en la UPIBI.

Un agradecimiento especial a Nadia Avilés y Leobardo Ordaz por su paciencia y ayuda en la tramitación. Gracias amigos!

DEDICATORIA

A mis padres Esperanza y Artemio

Gracias por su ejemplo de vida, su presencia y cariño, ha sido un largo camino pero gracias a sus consejos que me han guiado en mi camino han hecho de mí una persona de bien.

LOS QUIERO!!!

A todos mis hermanos y sobrinos.

Artemio, Javier, Lourdes, Alejandra, José Luís, Berenize, Esperanza, Bertha y Jhosa Jande; gracias por estar ahí siempre, los quiero a todos!, a mis queridos sobrinos: Jhosa, Javier, Eréndira, Héctor, Yaramen, Monse y Yael quienes han venido a este mundo para hacer más placentera mi estancia.

A ti María Elena

La vida te puso en mi camino
Y siempre estás en mi mente
Le doy gracias al destino
Porque estaré contigo para siempre.

Que afortunado soy de que estés conmigo, te agradezco todo el apoyo que me has brindado, llegaste en el momento más oportuno a mi vida. TE AMO MALINA.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	II
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. ORIGEN DEL MAÍZ	3
2.1.1. Importancia del maíz	4
2.2. EL VIGOR DE SEMILLAS	5
2.2.1. Determinación del vigor	7
2.3. ENVEJECIMIENTO	9
2.4. GERMINACIÓN.....	10
2.5. CICLO CELULAR	10
2.5.1. Puntos de control en el ciclo celular	11
2.5.2. Ciclo celular en plantas.....	12
2.5.3. Ciclinas y Cdks en las plantas	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. OBJETIVOS	15
4.1. OBJETIVO GENERAL	15
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1. MATERIAL BIOLÓGICO	16
5.2. ENVEJECIMIENTO ARTIFICIAL DE LAS SEMILLAS.....	16
5.3. PRUEBAS FISIOLÓGICAS.....	18
5.3.1. Prueba de Germinación Normal.....	18
5.4. PRUEBAS BIOQUÍMICAS	18
5.4.1. Imbibición de los ejes embrionarios de maíz.....	18
5.4.2. Extracción de proteínas de los ejes embrionarios de maíz	18
5.4.3. Cuantificación de proteínas por el Método de Bradford	19
5.5. ENSAYO DE WESTERN BLOT.....	19
5.5.1. Técnica SDS-PAGE	19
5.5.2. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	19
5.5.3. Transferencia de proteínas a membrana de Immobilon	20
5.5.4. Incubación de anticuerpos.....	21
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
5.7. ANÁLISIS MOLECULAR.....	22
5.7.1. Extracción de ARN	22
5.7.2. RT-PCR semiquantitativo	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
6.1. PRUEBAS FISIOLÓGICAS	24
6.1.2. Prueba de germinación normal.....	24
6.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	29
6.2.1. Nivel de acumulación de proteínas.....	29
6.4. ANÁLISIS MOLECULAR.....	38
6.4.1. Análisis de transcritos de genes del ciclo celular mediante RT-PCR	38
7. CONCLUSIONES	41
8. REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Semilla de maíz y sus componentes morfológicos (Curtis, 2001)	4
Figura 2. Eventos fundamentales en el control del inicio del ciclo celular eucariote (Sysmex, 2011).	11
Figura 3. Plántulas normales obtenidas en la germinación de las semillas de tres variedades nativas de maíz bajo dos tratamientos de envejecimiento artificial. T=Testigos, CH=calor húmedo (41°C, 72 h y 100% h. r.) y CS=calor seco (60°C, 48 h)	25
Figura 4. Porcentaje de germinación de plántulas anormales (PA %) de los 9 tratamientos a los 7 días incubación. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.....	26
Figura 5. Porcentaje de semillas muertas (SM %) de los 9 tratamientos a los 7 días de incubación.	26
Figura 6. Longitud de plúmula (LP), radícula (LR) y total (LT) de plántulas de los 9 tratamientos. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.	27
Figura 7. Peso seco de plúmula (PSP), radícula (PSR) y total (PST) de los 9 tratamientos. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.	27
Figura 8. Western blot usando anticuerpo anti-Cyc D5 para los extractos de proteínas de ejes embrionarios de maíz a las 12 y 24 de imb. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.....	30
Figura 9. Western blot usando anticuerpo anti-Cyc A para los extractos de proteínas de ejes embrionarios de maíz a las 12 y 24 de imb. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.	31
Figura 10. Western blot usando anticuerpo anti-CDKA para los extractos de proteínas de ejes embrionarios de maíz a las 12 y 24 de imb. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.....	32
Figura 11. Western blot usando anticuerpo anti-ciclina D4 para los extractos de proteínas de ejes embrionarios de maíz a las 12 y 24 de imb. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.	33
Figura 12. Western blot usando anticuerpo anti-ciclina D2 para los extractos de proteínas de ejes embrionarios de maíz a las 12 y 24 de imb. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.	34
Figura 13. Western blot usando anticuerpo anti-PSTAIRE para los extractos de proteínas de ejes embrionarios de maíz a las 12 y 24 de imb. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.	35
Figura 14. Expresión de mRNA de la Ciclina D2,2A durante la germinación de maíz. Los ejes embrionarios de maíz fueron embebidos por los periodos de tiempo indicados en presencia de amortiguador de imbibición. d) análisis de la densitometría relacionada a la señal con la cantidad de rRNA cargado. T, control de las semillas; CH, tratamiento calor húmedo y CS, tratamiento calor seco.	39



ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Variedades de maíz empleadas.....	16
Cuadro 2. Número de tratamientos bajo estudio.....	17
Cuadro 3. Cantidades empleadas para la preparación del gel de poliacrilamida.	20
Cuadro 4. Condiciones empleadas para cada anticuerpo.....	21
Cuadro 5. Cuadrados medios del análisis de varianza practicado a las variables fisiológicas.....	24
Cuadro 6. Cuadrados medios del análisis de varianza practicado a las variables bioquímicas.....	37

I. INTRODUCCIÓN

La deterioración de la semilla que causa la pérdida de germinabilidad se ha atribuido a una serie de defectos metabólicos que se acumulan mientras que el proceso de la deterioración avanza (Ching, 1973, Roberts *et al.*, 1973, Sen and Osborne, 1977, Osborne, 1983). La germinación de la semilla es el proceso por el cual el embrión de la planta reanuda su crecimiento después de un período de quietud. Bajo condiciones favorables, el crecimiento rápido del embrión culmina en la ruptura de las capas de la cubierta y de la aparición de la radícula, que se considera la terminación de la germinación. En esta etapa, la decisión de las células individuales del embrión para entrar el ciclo celular de nuevo o a seguir arrestadas es crucial para determinar la formación de la plántula. La construcción de la forma y de la función de la planta depende de la capacidad de las células embrionarias de reanudar la división y diferenciación. La comprensión de cómo los genes del ciclo celular trabajan en esta fase particular de desarrollo de la planta pudo ayudar a aclarar los acontecimientos celulares y estructurales que llevan a un embrión quiescente a una planta metabólicamente activa (Barroco *et al*, 2005).

El ciclo celular es una serie de acontecimientos cíclicos coordinados, ocurriendo entre el final de las divisiones de célula subsecuentes, por las cuales el material celular es duplicado y dividido entre las células hijas. Así, el ciclo celular consiste en dos grandes eventos, la replicación del DNA (fase S) y la mitosis (fase M) separada por dos fases gap, G1 y G2 (Dewitte y Murray, 2003). La fase G1 se asume para ser la puerta a través de la cual la mayoría de las células reanudan la progresión del ciclo celular después de un período de no proliferación. Además, la transición de G1 a S es el blanco central de la interferencia entre la activación/progresión del ciclo celular y las señales ambientales (Rossi y Varotto, 2002).

Tomando en cuenta que la germinación de la semilla implica la reanudación de la progresión del ciclo celular después de un período quiescente, la entrada en G1 y la activación del interruptor de G1 a S puede representar un control importante en el desarrollo temprano de la *plántula*. El paso progresivo a través de varias fases del ciclo celular es controlado por un mecanismo conservado basado en la formación secuencial transitoria y la activación de complejos entre las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y sus subunidades que activadoras, las ciclinas (Cyc) (De Veylder *et al*, 2003).



Por tanto, el objetivo del presente estudio fue contribuir al conocimiento de las características, fisiológicas, bioquímicas y moleculares de las semillas de tres variedades nativas de maíz, así como evaluar las alteraciones causadas en ellas por el envejecimiento artificial.

2. ANTECEDENTES

2.1. ORIGEN DEL MAÍZ

La observación y el estudio de las especies bajo domesticación, fueron los elementos importantes que condujeron al gran naturalista inglés Charles Darwin a postular lo que muchos consideramos como la idea más revolucionaria en las ciencias naturales y el cimiento de la biología moderna: la teoría de la evolución por medio de la selección natural. La selección bajo domesticación es una modalidad que simula el proceso de selección natural, pero conducido por y para los fines de interés humano. El maíz es un ejemplo excepcional de la interacción de la humanidad con los recursos naturales disponibles. Ha sido un proceso iniciado hace más de seis mil años, y operado sobre los ancestros silvestres del maíz, principalmente el teocintle. El producto de ese proceso es una enorme diversidad de formas, texturas, colores, comportamientos y adaptaciones geográficas de las variedades de maíz, diversidad con la que muy pocas otras especies cultivadas se le comparan (Kato *et al.*, 2009).

El maíz, uno de los tres granos básicos que alimentan a la humanidad, tuvo su origen y diversificación inicial en las montañas y valles de México, por medio de la intervención de los antiguos pobladores de este territorio en un proceso coevolutivo que condujo a la formación de una de las plantas cultivadas de mayor diversidad genética, cuya riqueza aún se mantiene en este país, principalmente por los productores del medio rural (Kato *et al.*, 2009).

El maíz se empezó a cultivar hace unos miles de años. Sus restos más antiguos son unas pequeñas mazorcas que datan del año 3600 a. C., encontradas en cuevas de la región árida de Tehuacán, Puebla, México. Se considera que el maíz proviene del teocintle (*Zea mays sp. mexicana* L) que crece de manera silvestre en la Mesa Central de México (Wilkes, 1977). Debido a que en México se encuentra la mayor riqueza en diversidad genética de esta planta, se le considera centro de origen y de diversidad biológica del maíz (Vavilov, 1931).

El maíz posee una gran diversidad genética, la cual se refleja en sus múltiples variantes morfológicas de la planta, mazorca y grano, su amplia adaptación a gran número de ambientes, etc., y además, por sus diversos usos como alimento humano o animal, así como por la gran variedad de productos que se obtienen de esta especie (Paliwal, 2001). En México, el maíz por su diversidad en formas y usos, tiene un significado e importancia histórica y presente tal, que se ha calificado a los mexicanos como “gente de maíz”. Sin embargo, además de esta enorme diversidad, el maíz ha resultado ser, por sus especiales rutas metabólicas, una verdadera fábrica de productos industriales, por lo que sobre todo en países considerados desarrollados adquiere otro sentido, más utilitario.

La amplitud de los productos derivados del maíz es tal, que en países, como los Estados Unidos, la población utiliza en su dieta, en la salud y usos industriales, un nivel mucho más alto de productos derivados del maíz que lo que ocurre en México. El maíz está, de una u otra forma, presente en la vida diaria de cientos o miles de millones de personas en el mundo. Por ello, Walton C. Galinat, un agrónomo y etnobotánico de la Universidad de Harvard, estudioso del maíz por más de medio siglo, se refirió a éste como “el grano de la humanidad” (Kato *et al.*,2009). Botánicamente, la semilla del maíz (*Zea mays* L.) es un fruto seco e indehiscente denominado cariósipide, en el cual el embrión está adherido a todos los componentes del óvulo desarrollado (escutelo, al endospermo, capa de aleurona y pericarpio) (Figura 1).

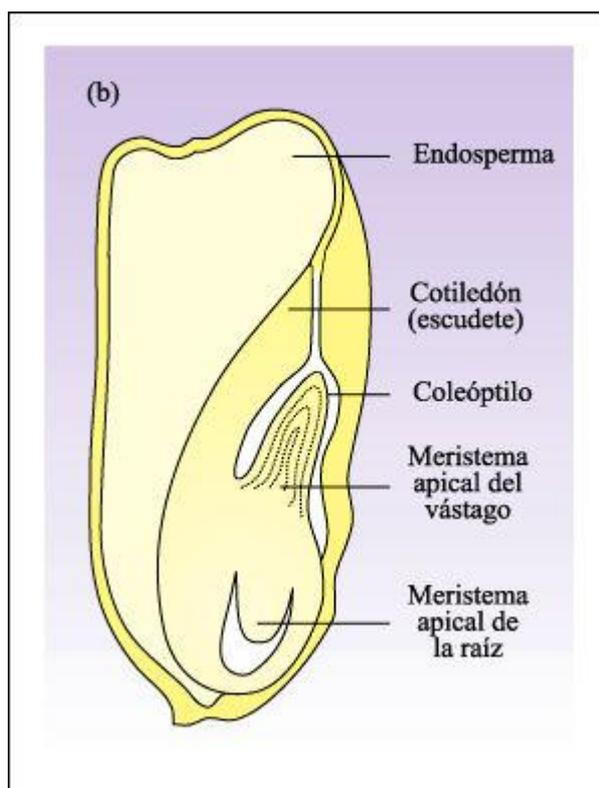


Figura 1. Semilla de maíz y sus componentes morfológicos (Curtis, 2001)

2.1.1. Importancia del maíz

Al ser el maíz el principal alimento en la población mexicana, éste es a su vez la principal fuente de aporte de nutrientes, en México el maíz consumido directamente suministra más de la mitad de las calorías y una tercera parte de las proteínas consumidas por la población, sobre todo en las zonas rurales (Delgado, 2003). En el año 2007 el consumo *per cápita* de maíz en México fue de 122.94 kg/persona/año equivalente a 336.82 g/persona/día, mismos que suministran un aporte diario de 1042.64 kcal/persona/día, 26.86 g/persona/día de proteínas y 11.56 g/persona/día de grasa vegetal (FAOSTAT, 2010).

El maíz es el cereal más consumido en México y las razas cultivadas de forma tradicional por los agricultores locales contribuyen a la conservación y a la generación de su diversidad genética *in situ* (Bommer, 1991). De esta manera los productores contribuyen al mantenimiento de las variedades locales al reproducirlas seleccionando deliberadamente las mejores semillas, aprovechando las diferentes variaciones ocurridas de manera natural (Dobzhansky, 1982).

En los Valles Altos Centrales de México se estiman 1.5 millones de ha dedicadas al cultivo de maíz, de las cuales el 85% son siembras de temporal. De las hectáreas de temporal, los productores destinan aproximadamente el 35% de la superficie disponible para la siembra de maíz con diferente color de endospermo (azul principalmente) de los cuales se estima una cosecha anual de 300 mil ton, y son los estados de Puebla, Tlaxcala, México e Hidalgo los principales productores de maíz azul (Antonio *et al.*, 2004).

Las antocianinas, pigmentos presentes en la capa de aleurona y/o en el pericarpio confieren los colores negros, morados y rojos que se observan en los granos de maíz (Wellhausen *et al.*, 1951; Salinas *et al.*, 1999). La capa de aleurona del grano de maíz azul contiene a la antocianina azul, y esta es la razón de su color característico (Beltrán *et al.*, 2001). Las antocianinas se derivan de la cianidina y pelargonidina y son compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides (Harborne y Gavazzi, 1969).

El grano azul con endospermo harinoso posee mayor valor alimenticio debido a que su contenido de minerales es más alto que el de otras variedades; además, se han detectado altos contenidos de lisina en el maíz azul (2.3 mg/g de grano seco) respecto a dos variedades comerciales de maíz amarillo (1.4 mg/g) y blanco (1.6 mg/g) empleados para hacer tortillas (Dickerson, 1990). Así, los maíces azules son una fuente más completa de proteínas que maíces blancos y amarillos (Dickerson, 2003). Pero las características más acentuadas del maíz azul son su atractivo color y su sabor (Antonio *et al.*, 2004) y un mayor valor comercial, cualidades por las que ha permeado en los mercados con mucho éxito.

2.2. EL VIGOR DE SEMILLAS

El conocimiento del vigor, como componente de la calidad fisiológica de la semilla, es muy importante para garantizar densidades de población óptimas, con fines de maximizar rendimientos y/o calidad de la producción (Hampton y Coolbear, 1990); se utiliza para explicar las diferencias en comportamiento de distintos lotes de semillas (Perry, 1983).

El vigor de semillas se define como el conjunto de propiedades que determinan su potencial para una emergencia rápida y uniforme, así como un desarrollo de plántulas normales bajo diversas condiciones

de campo (ISTA, 2001) produciendo mayor cantidad de materia seca en menor tiempo (Villaseñor, 1984). La definición lleva implícitos aspectos particulares del comportamiento que han sido considerados variaciones evidentes asociadas con el vigor, como son los procesos bioquímicos y reacciones en el transcurso de la germinación, tales como la actividad respiratoria y reacciones enzimáticas, la velocidad y uniformidad de la germinación de la semilla y crecimiento de la plántula, la velocidad y uniformidad de la emergencia de la plántula y crecimiento en el campo, y la capacidad de emergencia de las semillas bajo condiciones desfavorables (Abascal, 1984).

No obstante, pueden ocurrir variaciones en el vigor por factores como: la constitución genética, las condiciones ambientales y nutrición de la planta madre, el estado de madurez en la cosecha, el tamaño, peso y densidad de la semilla, así como su condición física e integridad mecánica, el grado de deterioro o envejecimiento y la presencia de patógenos (Abascal, 1984).

Según Heydecker (1972), el vigor de semilla puede expresarse de cuatro maneras:

(a) sobrevivencia intacta cuando culmina una condición de quiescencia: la semilla vigorosa mantiene esta característica; (b) sobrevivencia cuando es sembrada en campo: la semilla vigorosa resiste o supera las condiciones adversas imperantes; (c) capacidad para establecer plantas: la semilla vigorosa posee cantidad suficiente de reservas adecuadas y las utiliza durante las fases de crecimiento heterótrofo y de transición, y (d) capacidad de crecimiento: la semilla vigorosa origina una planta que crece vigorosamente durante la fase de crecimiento autótrofo.

El deterioro se refiere al complejo de cambios que ocurren con el transcurrir del tiempo, que causan perjuicios a los sistemas y funciones vitales y disminuyen la capacidad de desempeño de la semilla. El deterioro de semillas incluye cualquier transformación degenerativa irreversible, después de que la semilla ha alcanzado su máximo nivel de calidad (máximo contenido de materia seca). Para Delouche (1976) el deterioro es “inexorable, irreversible y mínimo en la madurez; su progreso es variable entre las especies, entre lotes de semilla de una misma especie y entre semillas del mismo lote”.

Las transformaciones degenerativas en la semilla son de origen bioquímico, fisiológico y físico, y ocurren en la siguiente secuencia:

- Degeneración de las membranas celulares y posterior pérdida del control de la permeabilidad celular.
- Daños en los mecanismos de producción energética y de biosíntesis.
- Reducción de la actividad respiratoria y de biosíntesis.
- Germinación más lenta.
- Reducción del potencial de almacenamiento.
- Crecimiento y desarrollo de la planta más lentos.

- Menor uniformidad en el crecimiento y desarrollo de las plantas.
- Mayor susceptibilidad a factores ambientales adversos.
- Reducción del potencial para el establecimiento de una población de plantas.
- Mayor porcentaje de plántulas anormales.
- Pérdida del poder germinativo (Popinigis, 1977).

El vigor de semillas y el deterioro están fisiológicamente ligados porque son aspectos recíprocos de la calidad de las semillas. El deterioro tiene una connotación negativa, en tanto que el vigor tiene una muy positiva; de este modo, el vigor disminuye a medida que el deterioro aumenta. El deterioro es el proceso de envejecimiento y muerte y el vigor es el principal componente de calidad afectado por el proceso de deterioro (Delouche, 1976).

El vigor es un rasgo genético propio de la planta, el cual es expresado a nivel de semilla, pero que se ve afectado por factores tales como la nutrición de la planta madre, daños mecánicos ocasionados durante la cosecha, el procesamiento y el almacenamiento (Villaseñor, 1984).

Para obtener adecuadas densidades de población y altos rendimientos, se requieren niveles satisfactorios de vigor en las semillas en adición a los criterios tradicionales de germinación, pureza y sanidad (Perry, 1977). Alrededor de la madurez fisiológica de las semillas es cuando se obtienen los máximos niveles de vigor, la cual hace referencia a la máxima acumulación de materia seca que alcanza la semilla (Andrade, 1991; Cruz, 1995).

Las clasificaciones visuales y el grado de desarrollo son buenos estimadores del vigor de plántula, por lo que son recomendables para caracterizar lotes de semilla o para seleccionar plántulas que expresen su genotipo en relación a esta característica (Virgen, 1983). Algunos investigadores consideran que las variables relacionadas con el peso seco producido por las plántulas, son los mejores estimadores de vigor (Villaseñor, 1984; Sandoval, 1995).

2.2.1. Determinación del vigor

Las pruebas de vigor son más sensibles a la pérdida de calidad de las semillas, porque hacen que se manifiesten las eventuales diferencias potenciales de los lotes de semillas. Sin embargo, sus resultados no necesariamente pronostican la emergencia de las plántulas, sino que dan elementos de juicio al productor para determinar si un lote de semillas es superior a otro. Esta superioridad está dada por la constitución genética del lote de semillas, las condiciones ambientales prevalecientes durante su período de desarrollo en la planta madre, las características del almacenamiento y,

finalmente, por las condiciones ambientales que ocurran en el campo, durante el desarrollo de tales semillas. Dichas condiciones pueden ser tan severas que impidan la emergencia, incluso para los lotes de semillas muy vigorosas (McDonald, 2002). Es por esto que una prueba de vigor sólo indicará el comportamiento probable y comparativo entre lotes de semillas cuando las condiciones sean adversas; al mismo tiempo identificará aquellos lotes que presenten máximos niveles de tolerancia y adaptabilidad a dichas condiciones (Perry, 1984).

Las pruebas de vigor representan el comportamiento potencial de un lote de semillas en el campo (Sako *et al*, 2001), y serían un criterio para establecer su precio (McDonald, 2002) y, finalmente, para decidir sobre el uso de las semillas y sus necesidades de almacenamiento para prevenir pérdidas económicas (Fay *et al.*, 1993).

Además de las alteraciones en los procesos bioquímicos, condiciones de alta humedad en las semillas y/o elevadas temperaturas durante el almacenamiento, que conducen a un rápido envejecimiento, son tomadas como base para la ejecución de pruebas de vigor. La relación entre la humedad de las semillas y las temperaturas de almacenamiento sugiere que el éxito de un período de almacenamiento a una temperatura y contenidos de humedad determinados, será altamente reproducible para cualquier lote de semillas. La comparación de las respuestas de algunos lotes solo es posible a través del control preciso de la temperatura y contenido de humedad, de tal manera que el mismo grado de envejecimiento o deterioro, podría ser impuesto a cada lote de semillas (Powell, 1995).

Según Powell (1995), la prueba de deterioro controlado permite distinguir el vigor entre lotes de semillas que están sufriendo una disminución en su supervivencia, por estar todas las semillas sometidas a niveles similares de deterioro por alto contenido de humedad y elevada temperatura

El deterioro controlado a un contenido de humedad constante, refleja el método de almacenamiento de muchas especies en sacos de papel aluminio más que en almacenamiento abierto, reflejando su potencial de almacenamiento, lo que también ocurre con el envejecimiento acelerado (Powell, 1995).

Asimismo, la prueba de envejecimiento acelerado es una de las pruebas de vigor más populares por su fácil estandarización (Tekrony, 1995) y aplicación a un amplio intervalo de cultivos (McDonald, 1995)

2.3. ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento o deterioro de las semillas es un conjunto secuencial de eventos bioquímicos y fisiológicos que reducen progresivamente la calidad de la semilla, llegando hasta la pérdida de su viabilidad (Marcos-Filho y McDonald, 1998), menoscabando los rendimientos potenciales y, por ende, causando pérdidas económicas (McDonald, 1999).

El deterioro motiva la deficiencia generalizada en los procesos metabólicos durante la germinación, incluyendo defectos en la respiración y funcionalidad de la membrana celular, síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos, y metabolismo del DNA, entre otros (Cruz *et al.*, 1995). McDonald (1999) arguye que el deterioro de semillas, es diferente en cada especie y genotipo, es influenciado por factores ambientales y biológicos y, además, no ocurre uniformemente ni en cada semilla ni en cada lote de ellas.

En el mismo sentido, Anderson (1973) menciona que el deterioro de la semilla disminuye la capacidad germinativa, la velocidad de crecimiento de la planta y la tolerancia a condiciones adversas. Dichos efectos están asociados con cambios en el metabolismo a través de procesos bioquímicos, tales como la actividad metabólica durante las primeras horas de germinación, misma que se ha correlacionado con la aptitud germinativa y el vigor de la semilla. El mismo autor aduce que los síntomas de la semilla deteriorada incluyen pérdida de compuestos solubles debido a una excesiva permeabilidad de la membrana, reducción de la actividad enzimática, y producción de sustancias tóxicas como ácidos grasos libres.

La escasa o nula funcionalidad de las membranas seminales es consecuencia de la peroxidación de los lípidos que las constituyen, lo que conlleva a una desorganización y pérdida de actividad metabólica (Wilson y McDonald, 1986). Además, una excesiva permeabilidad de la membrana provoca pérdida masiva de azúcares, iones orgánicos y aminoácidos, entre otros componentes celulares y algunos de ellos podrían reducir sus concentraciones respecto a las óptimas para la respiración, actividad enzimática y síntesis de macromoléculas.

Basavarajappa *et al.* (1991) mencionan que una causa importante de la muerte de semillas es la pérdida severa de reservas en el embrión, y a medida que avanza el proceso de deterioro de la semilla se ven afectados el crecimiento y desarrollo de una nueva plántula, lo cual se expresa por anomalías y daños en sus estructuras principales.

2.4. GERMINACIÓN

La germinación incorpora una serie de eventos que comienzan con el ingreso de agua a una semilla seca y quiescente (imbibición) y terminan con la elongación del eje embrionario (Bewley y Black, 1994).

Durante la imbibición, la semilla quiescente reanuda su metabolismo. Las estructuras y enzimas necesarias para este despertar metabólico se encuentran, generalmente, en la semilla seca, habiendo resistido, al menos parcialmente intactas, las etapas de secado y maduración de la semilla (Bewley y Black, 1994). Algunas de las proteínas indispensables durante las primeras etapas de la germinación son degradadas rápidamente durante la imbibición para reemplazarse posteriormente con proteínas sintetizadas *de novo* (Bewley, 1982). La germinación es también un sistema apropiado para el estudio del ciclo celular en plantas, ya que la imbibición reactiva a las células meristemáticas, que se encuentran en su mayoría en la fase G1 respecto al contenido de DNA, para entrar al ciclo celular (Vázquez y de la Paz, 2003). Bioquímicamente la germinación abarca desde la imbibición de la semilla hasta el término de la primera ronda de división celular (Vázquez y de la Paz, 2003).

2.5. CICLO CELULAR

La proliferación celular requiere que las células incrementen su tamaño a tal punto que se dividan. Cada una de estas células contiene una copia completa del material genético, el cual se duplicó durante el proceso de crecimiento celular y finalmente se distribuyó equitativamente entre las nuevas células. La coordinación de los eventos que permiten una proliferación ordenada está dada por el proceso conocido como Ciclo Celular. Tradicionalmente, el ciclo celular ha sido dividido en 4 etapas, las cuales son G1, S, G2 y M; una quinta etapa sería el proceso por el cual las células se separan formando dos nuevas, al que se denomina citocinesis (Vázquez, 2006).

Al ciclo también se le puede dividir en dos fases: interfase y mitosis, donde la primera comprende las fases G1, S y G2. Generalmente durante la fase G1 (de gap o espacio), las células perciben las condiciones medio-ambientales en que se encuentran y comienza una etapa de crecimiento celular (Figura 2). Habiendo condiciones adecuadas para la proliferación, las células entrarán a la fase S (de síntesis), en la cual ocurrirá la duplicación del material genético (el DNA) que será posteriormente repartido entre las células hijas. La fase G2 (gap 2) tendrá como principal función el asegurarse que el material genético, o DNA, ha sido correctamente duplicado y que existen las condiciones necesarias para que se pueda repartir. Finalmente, durante la fase M (mitosis), los cromosomas duplicados son compactados, alineados en el plano de metafase y cada copia de los cromosomas es movilizad hacia extremos opuestos de la célula, lo que permitirá la

formación, primero de dos núcleos con idéntica información genética y, posteriormente, de dos nuevas células (Vázquez, 2006).

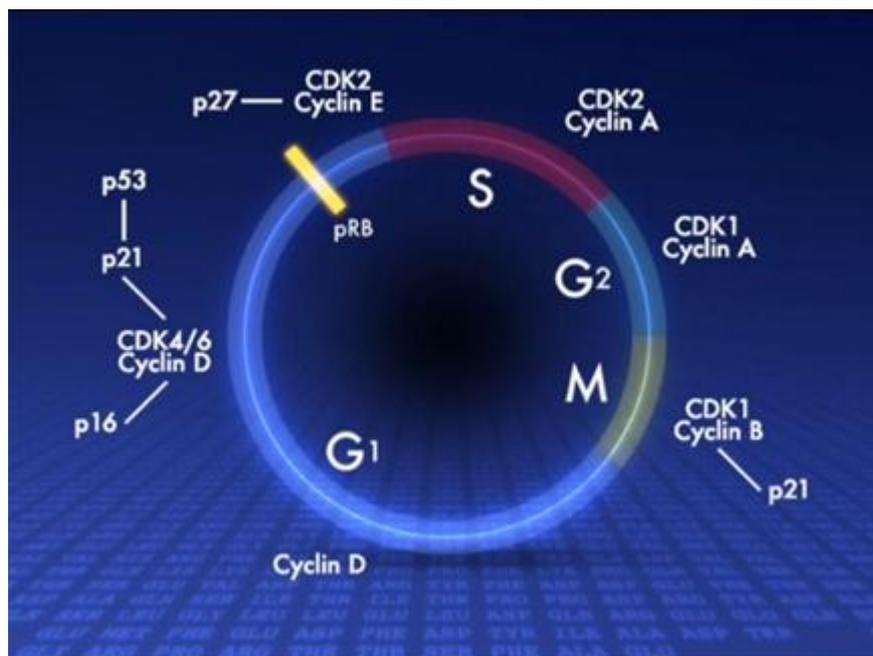


Figura 2. Eventos fundamentales en el control del inicio del ciclo celular eucariote (Sysmex, 2011).

Dado que es un ciclo, a la salida de M las células se encontrarán nuevamente en G1 y, si las condiciones ambientales son óptimas, una nueva ronda de eventos moleculares dará origen a un nuevo ciclo celular, promoviendo así la proliferación. En general, la regulación de los eventos que constituyen el ciclo celular es muy estricta y no es usual que las diferentes fases que lo constituyen cambien de orden, aunque algunos tipos celulares, tanto en los animales como en las plantas, pueden acortar o suprimir alguna de las fases del ciclo, como sucede durante la endoreduplicación típica, por ejemplo en los tejidos de reserva en las semillas de las plantas. Ahora bien, desde el punto de vista molecular y de regulación del ciclo, dentro de cada fase habría subfases, i.e., anafase temprana o anafase tardía, G1 temprano y G1 comprometido, dado que las condiciones bioquímicas que las definen son totalmente diferentes y, en general, no reversibles (Vázquez, 2006).

2.5.1. Puntos de control en el ciclo celular

Los puntos de control (checkpoints) se han definido tradicionalmente como cascadas moleculares de señalización que provocan un retraso o una parada de ciclo como respuesta al daño en el DNA, proporcionando así más tiempo para su reparación y asegurando que los eventos previos del ciclo celular hayan ocurrido correctamente antes de proceder a la siguiente fase (Hartwell y Weinert, 1989). El daño en el DNA durante G1 por ejemplo, inhibe la entrada en fase S y con ello impide la replicación del DNA dañado. Si el estrés genotóxico ocurre durante la replicación del DNA, la célula sufre un retraso en fase S y, si el daño no es reparado, la célula sale de fase S y tiene una parada de ciclo en G2. La maquinaria implicada en los

checkpoints integra diversos procesos como la reparación del DNA, la remodelación de la cromatina, la modulación transcripcional o la muerte celular (Bartek et al., 2004). Por ello, las células con defectos en algún punto de las rutas que conforman los checkpoints son más sensibles a daño y estrés. También hay proteínas que participan en rutas de estos puntos de control que son necesarias para la viabilidad en ausencia de daño exógeno, lo que indica que los checkpoints son requeridos también para combatir el estrés endógeno durante la proliferación celular normal (Takeda y Dutta, 2005).

2.5.2. Ciclo celular en plantas

Aunque aún lejos de ser comprendidos en la manera en que se conocen los eventos en las células animales, los procesos que regulan el ciclo celular en las células vegetales han demostrado ser sorprendentemente semejantes, tanto en las proteínas que participan como en los mecanismos primarios de acción, lo que implica que los principios básicos del ciclo celular se han conservado a lo largo de la evolución. Esto a pesar de que hay claras diferencias entre animales y plantas en la forma en que se estructuran los organismos, siendo la organogénesis en plantas, a diferencia de los animales, un proceso casi completamente postembrionario, con una capacidad potencial de producir nuevos órganos, como raíces, hojas, tallos, flores, mediante conjuntos celulares particulares que proliferan y eventualmente siguen un programa de diferenciación específico (Desvoves, *et al.*, 2006), de tal forma que estos patrones organogenéticos pueden permanecer latentes y activables durante el periodo completo de vida de las plantas, permitiendo así un constante incremento en la talla y arquitectura del organismo. Dados ciertos cambios en el medio ambiente y promovidos por cambios hormonales internos, estos paquetes celulares pueden entonces desdiferenciarse en un momento dado, proliferar y eventualmente seguir un nuevo camino morfogénico particular que permita la aparición de las nuevas estructuras (Vázquez, 2006).

2.5.3. Ciclinas y Cdks en las plantas

El número de las ciclinas presentes en plantas es mayor que el que se ha descrito para las células animales. En *Arabidopsis* se ha descrito la existencia de diferentes ciclinas, entre las mejor descritas están las pertenecientes a las familias A, B y D. En general las ciclinas se distinguen por una secuencia poco conservada de aminoácidos, conocida como caja de las ciclinas, a la que se une la Cdk. Dentro de las ciclinas A se pueden encontrar tres subtipos, CycA1, CycA2 y CycA3 y cada uno de éstos tiene variantes (10 en total); también existen de la misma manera tres subgrupos de ciclinas B (B1 a B3) con sus variantes (9 en total). Las ciclinas D (9 en total) están comprendidas en seis subgrupos (D1 a D6) y algunos de ellos con variantes (Renaudin, *et al.*, 1996; De Veylder, *et al.*, 1999; Vandepoele, *et al.*, 2002; Wang, *et al.*, 2004).

Las ciclinas A y B se asocian a los procesos que ocurren entre la fase S y la fase M. Se ha demostrado mediante cultivos celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum*, (Reichheld, *et al.*, 1996), *Arabidopsis* (Fuerst, *et*

al., 1996), *Catharanthus* (Ito, et al., 1997) y arroz (*Oriza sativa* (Hashimoto, et al., 1992)], que la expresión y acumulación de los transcritos para las ciclinas tipo B ocurre en la fase G2 tardía y particularmente en la fase M; por otra parte, la acumulación de los transcritos de las ciclinas A comienza desde la fase S. No ha sido demostrado fehacientemente que estas ciclinas A tengan una función específica dentro de la fase S, aunque podrían actuar de manera análoga a como lo hacen las ciclinas A en células animales (Vázquez, 2006).

Como se mencionó, las ciclinas D presentan una característica definida, que es la secuencia de los aminoácidos LXCXE en su extremo amino terminal, por la que se unen a la proteína RB (Sherr, 1994); esta secuencia está presente en el extremo amino de las ciclinas D de las plantas y se ha demostrado que se unen a la proteína RBR (o relacionada a RB) vegetal. Las ciclinas D presentan lo que se conoce como caja de ciclinas, las que pueden ser mono o bipartitas y la similitud es relativamente baja entre las diferentes proteínas (Meijer and Murray, 2001). Al igual que todas las ciclinas, las tipo D deberían ser de una vida media relativamente corta; sin embargo, la vida media de las diferentes ciclinas D en las plantas varía; esto podría deberse a que no todas presentan la secuencia de degradación típica, o caja PEST (por la secuencia de aminoácidos presente, (Sorrell, et al., 1999;)) y no existe evidencia de otro tipo de secuencia involucrada en el recambio proteico (Vázquez, 2006).

Las cinasas dependientes de las ciclinas (Cdks) en las plantas se han agrupado en 5 categorías diferentes, dependiendo del tipo de secuencia de unión a las ciclinas que presentan (Joubés, et al., 2000). En las plantas, la proteína Cdk-A es la cinasa estructuralmente homóloga a la Cdk1 y presenta el motivo PSTAIRE. A semejanza con las levaduras y a diferencia con las células de mamíferos, CdkA es activa desde G1 hasta G2, muy probablemente está asociada a diferentes ciclinas (Mironov, et al., 1999; Joubés, et al., 2000) y es la ciclina que se ha conservado en todas las especies vegetales estudiadas. Dependiendo de la especie, puede haber uno o dos diferentes genes codificando para CdkAs. Aparentemente *Arabidopsis* tiene solo uno, pero en maíz existen dos genes virtualmente idénticos, los que difieren sólo en las regiones no traducibles 3' y 5' (Colasanti, et al., 1991).

Estudios recientes del transcriptoma en las células sincronizadas de *Arabidopsis* o de tabaco, han mostrado que existe una periodicidad en la expresión de los genes del ciclo celular, genes cuyos productos se relacionan con el ciclo, genes cuyos productos participan en las vías de transducción de señales, genes que responden a hormonas y otros que participan en el control transcripcional y genes de vías metabólicas relacionadas con el avance del ciclo (Menges, et al. 2002; Breyne, et al., 2002). Este tipo de estudios son importantes porque dan indicios de cómo ocurren y se regulan los programas de desarrollo en las células vegetales.

3. JUSTIFICACIÓN

La reactivación del crecimiento embrional depende esencialmente de que sus tejidos se incorporen a la fase G1 y se engarchen en el ciclo celular, que superen los puntos de control y se dividan, pudiendo encontrarse variación genética para la regulación de este.

El envejecimiento de las semillas pudiera trastornar el ingreso de las células al ciclo celular, la sincronía del proceso y motivar respuestas diferentes a las observadas en las semillas control, aspectos que causan retrasos en la germinación y plántulas con malformaciones llevando a un bajo rendimiento en campo.

La tolerancia de las semillas al deterioro, pudiera estar relacionada con su aptitud genotípica para preservar o modificar las vías moleculares de entrada al ciclo celular. Por tanto es factible detectar marcadores bioquímicos y moleculares para la longevidad de semillas de maíz, cuya utilidad es de interés para el fitomejoramiento y para el manejo y la conservación de semillas.

El presente estudio posibilitará una mejor comprensión del fenómeno de la germinación, con énfasis en las opciones metabólicas a las que la semilla puede recurrir para cumplir con su cometido biológico y agronómico. Con base en este conocimiento será factible conformar tecnologías de manejo de semillas y de acondicionamiento de las mismas, tratándose en el primer caso de preservar la viabilidad y calidad biológica y en el segundo de resarcir los daños presentes hasta donde sea posible, o bien, de proveer las condiciones de germinación idóneas al estado metabólico de la semilla.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

1. Determinar si el envejecimiento artificial incide sobre el desempeño germinativo así como sobre la presencia de proteínas reguladoras del ciclo celular durante la fase germinativa inicial de semillas de tres variedades de maíz.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto del envejecimiento artificial húmedo y seco en el desempeño germinativo de semillas de tres variedades nativas de maíz, Cuijingo, Oaxaca y Chalqueño.
2. Cuantificar en las primeras 24 horas de germinación los niveles de las proteínas en las diferentes modalidades de envejecimiento de cada variedad.
3. Identificar indicadores del vigor y longevidad de las semillas, así como la variación de los mismos por efecto del genotipo y condición de envejecimiento.
4. Establecer las modificaciones en la acumulación de proteínas del ciclo celular causadas por el envejecimiento de las semillas, su genotipo y su nivel de vigor.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó durante 2008 al 2010 en el laboratorio de Biotecnología de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), del Instituto Politécnico Nacional (IPN), así como en el laboratorio 114 de la Facultad de Química de la UNAM.

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se emplearon semillas de tres variedades de maíz, dos azules proporcionadas por el Programa de Maíz del Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), y una variedad de maíz blanco raza Chalqueño adquirida con productores del valle de Chalco, México, las tres variedades con origen 2005 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variedades de maíz empleadas.

Variedad	Origen	Raza
Cuijingo	†AM-05	Chalqueño
Oaxaca-711	††SL-05	Bolita
Chalqueño	†††VC-05	Chalqueño

† AM= Amecameca, Méx., ††SL= Santa Lucia, Méx., †††Valle de Chalco, Méx.

5.2. ENVEJECIMIENTO ARTIFICIAL DE LAS SEMILLAS

Las semillas de las tres variedades de maíz, se sometieron a dos modalidades de envejecimiento artificial, las cuales fueron con calor húmedo (CH) y calor seco (CS), como se indica a continuación:

- a) **Calor húmedo (CH):** Se emplearon recipientes plásticos herméticos tipo Sandwicheras (10.5x10.5x4.5 cm) como las descritas por McDonald (1998); a los cuales se les puso un soporte de malla de tela galvanizada sobre la que se depositaron las semillas evitando de esta forma el contacto directo de éstas con el agua bidestilada, que en cantidades de 150 mL fue depositada en tales recipientes. En el agua se adicionó ácido bórico (5 %, p/v) como fungicida. Las semillas una vez colocadas sobre la malla y selladas herméticamente las cajas plásticas, se metieron a una incubadora (Thermolyne Type 41900 Incubator, USA) a 41 °C. El tiempo de exposición fue de 72 h, asumiendo en todos los casos que en el ambiente interno se alcanzaban niveles altos de humedad relativa (100 %).
- b) **Calor Seco (CS):** En este tipo de deterioro, las semillas se colocaron y distribuyeron uniformemente de forma directa en cajas Petri de vidrio y se metieron a una incubadora (LAB-LINE® L-C Incubator, USA) a 60 °C por 48 h.

Cuadro 2. Número de tratamientos bajo estudio.

Variedad	Tratamientos	Envejecimiento
Chalqueño	1	Testigo
	2	CH
	3	CS
	4	Testigo
Oaxaca-711	5	CH
	6	CS
	7	Testigo
Cuijingo	8	CH
	9	CS

5.3. PRUEBAS FISIOLÓGICAS

5.3.1. Prueba de Germinación Normal

Para medir el efecto del envejecimiento artificial, se realizó la prueba de germinación con y sin envejecimiento a las variedades de maíz empleadas. Para ello se emplearon cinco repeticiones de 10 semillas como unidad experimental por tratamiento. Las semillas se pusieron a germinar en toallas de papel húmedo enrolladas y colocadas verticalmente dentro de bolsas de plástico para evitar pérdida de humedad y poder mantener un nivel de hidratación más o menos constante adicionando agua cada que se requiera. Todas las semillas se pusieron a germinar a temperatura ambiente (25 ± 4 °C) durante siete días. En este estudio se cuantificó el porcentaje de plántulas normales (PN7), plántulas anormales (PA) y semillas muertas (SM), asimismo de las plántulas normales se midió la longitud de plúmula (LP), longitud de raíz (LR) y la longitud total (LT). Además, se cuantificó el peso seco acumulado en cada uno de estos órganos (PSP, PSR y PST), respectivamente. Para la realización de estos experimentos se utilizaron semillas completas.

5.4. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

5.4.1. Imbibición de los ejes embrionarios de maíz

Para realizar las pruebas bioquímicas se emplearon los ejes embrionarios de semillas de maíz de las tres razas bajo estudio. Para ello, con la ayuda de una navaja se extrajeron manualmente los ejes embrionarios de las semillas procurando no dañarlos y obtenerlos completos. Una vez extraídos los embriones estos fueron dispuestos sobre una caja Petri a la cual se le acondicionó papel filtro sobre el cual se colocaron los ejes embrionarios previamente desinfectados con cloro al 10 % y secados en papel absorbente estéril, y posteriormente se les adicionó 1 mL de amortiguador de imbibición (50 mM Tris-HCL pH 6.2, 2 % sacarosa y 10 mM $MgCl_2$) estéril. Para la germinación de los ejes embrionarios, las cajas Petri tapadas se incubaron a 25°C a intervalos de tiempo de 12 y 24h.

5.4.2. Extracción de proteínas de los ejes embrionarios de maíz

Los ejes embrionarios incubados se extrajeron de la caja y se homogenizaron con Nitrógeno líquido en un mortero estéril, adicionando 1mL de buffer de extracción de proteínas (Tris-HCl, 25 mM, pH 7.5; $MgCl_2$, 15 mM; NaCl, 75 mM; EDTA 5 mM, pH 8.0; DTT, 7.5 mM; Tritón X-100, 0.1 %; Sacarosa 0.25 mM, KCl 25 mM, EGTA 1 mM, NaF 50 mM y glicerol fosfato 6 0mM y una tableta de inhibidor de proteasas Complete® por cada 10 mL de buffer). La mezcla homogenizada se centrifugó en tubos Eppendorf estériles durante 1h a 12 000 rpm y 4 °C. Al término, se colectó la fracción soluble la cual contenía las proteínas en tubos estériles y se centrifugó nuevamente durante 1 h a 12 mil rpm y 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf

nuevo y estéril de 1.5 mL y las proteínas obtenidas de las muestras se confinaron a -70 °C para evitar su deterioro.

5.4.3. Cuantificación de proteínas por el Método de Bradford

Para determinar la cantidad de proteína contenida en los extractos crudos se empleó el método de Bradford (1976). Para lo cual se utilizó una placa de Elisa de 96 pozos, en ella se realizó por duplicado una curva patrón, colocando Albúmina Sérica Bovina en concentraciones finales de 1.2; 2.4; 3.6; 4.8; 6; 7.2; 8.4; 9.6; 10.8 y 12 µg/µL a un volumen final de 100 µL, posteriormente se agregaron a cada punto de la curva patrón 150 µL del Reactivo de Bradford (dilución 1:4 de Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad).

La cuantificación de las muestras se realizó por duplicado, colocando 99 µL de agua desionizada, 1 µL de muestra y 150µL del Reactivo de Bradford.

La lectura de la absorbancia, tanto de la curva patrón como de las muestras, se efectuó en el Microplate Manager Biorad Labs.Inc.

5.5. Ensayo de Western Blot

5.5.1. Técnica SDS-PAGE

Se colocaron 50 µg de proteína de cada tratamiento en cada pozo y se le agregó amortiguador de carga (Tris-HCl 1M pH 6.8; SDS 4 %; Glicerol 20 %; Azul de bromofenol 0.02 %, β-mercaptoetanol 10 %) en cantidades iguales. Las muestras se mezclaron y para desnaturalizar las proteínas los tubos con las muestras se calentaron a 80 °C en una placa de calentamiento durante 10 min y transcurrido este tiempo se sacaron y fueron colocadas en hielo para parar la reacción. La mezcla atemperada se cargó en el gel de poliacrilamida al 12%.

5.5.2. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Esta técnica consiste en hacer pasar una mezcla de proteínas a través de un soporte sólido formado por una malla de moléculas de Acrilamida entrecruzadas con Bis-acrilamida y gelificadas con TEMED y Persulfato de amonio. La energía que dirige a las proteínas por la malla es un campo eléctrico. En el caso de la electroforesis desnaturalizante, todas las proteínas están cargadas negativamente debido a que están en una solución con detergente (SDS), por lo que van a correr hacia el ánodo.

En un tubo Falcon con capacidad de 50 mL se colocaron los reactivos (Cuadro 3) para la preparación del gel separador, se mezclaron y vaciaron sobre los moldes correspondientes, se adicionó 1 ml de isopropanol

para evitar la formación de burbujas en la superficie del gel y se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 10 min. Al término se retiró el isopropanol, se lavó con agua destilada y se vertió la mezcla del gel apilador (Cuadro 3). Se colocó el peine separador de carriles y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, se retiró el peine y se limpió el exceso de acrilamida de los pozos usando una aguja.

Cuadro 3. Cantidades empleadas para la preparación del gel de poliacrilamida.

Reactivos		Gel Separador 12 %	Reactivos	Gel Concentrador 5 %
Acrilamida: (30:0.8)	Bisacrilamida	6.2 mL	Acrilamida: Bisacrilamida (30:0.8)	0.81 mL
Tris-HCl 0.75 M	pH 8.8	4.0 mL	Tris-HCl 0.75 M	pH 6.8
Agua destilada		5.8 mL	Agua destilada	2.5 mL
Persulfato de amonio 10 %		150 μ L	Persulfato de amonio 10%	50 μ L
TEMED		15 μ L	TEMED	10 μ L

Los geles previamente preparados, se colocaron en una cámara de electroforesis (BIORAD Mini Protean Tetra Cell) y se agregaron 500 ml de buffer de electrodos (Tris-HCl 0.025 M, pH 8.0, Glicina 0.2 M y SDS 1 %). Posteriormente, se cargaron 50 μ g de las muestras, previa preparación, en los pozos y se hizo pasar una corriente de 85 V durante 2.5 h.

5.5.3. Transferencia de proteínas a membrana de Immobilon

Se utilizaron membranas PVDF (Immobilon-pSQ Millipore) con tamaño de poro 0.45 μ y 9 x 6 cm como soporte sólido. Estas membranas son de naturaleza hidrofóbica y presentan ventajas frente a las de nitrocelulosa, ya que retienen mayor cantidad de proteínas, son compatibles con la mayoría de los sistemas de detección, mecánicamente son más estables y presentan una gran resistencia química a los reactivos utilizados para la identificación de las proteínas.

Previamente, se restauraron las membranas sumergiéndola en Metanol al 100 % durante 10 min y posteriormente sumergiendolas en agua destilada durante 10 min para retirar el exceso de metanol. Al finalizar, se sumergieron la membrana y el gel de poliacrilamida en el amortiguador de transferencia (CAPS 10 %, pH 8.0; Metanol 20 %) durante 10 min a fin de equilibrarlos. Los geles de poliacrilamida que contienen a las proteínas fueron embebidos en la misma solución de transferencia. Lo mismo ocurrió con los papeles filtro que se utilizaron. Las membranas PVDF y los papeles filtro fueron recortados al tamaño del gel.

Al término, se colocaron en el equipo de transferencia (Milipor II, Pharmacia Biotech) 3 rectángulos de papel filtro cortados al tamaño de la membrana, previamente humectados con el buffer de transferencia, la

membrana de transferencia, el gel de poliacrilamida y 2 rectángulos más de papel filtro humectados con buffer de transferencia. Se retiraron las burbujas de aire capturadas entre las capas con un rodillo.

El sistema se colocó entre placas de electrodo de grafito con el ánodo en la parte inferior. La transferencia se llevó a cabo manteniendo una corriente de 75 mA por gel durante un periodo de 2 h (Fuente de poder LKS, Bromma). Las proteínas quedaron unidas a la membrana de forma no covalente, mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.

Finalizada la transferencia, se retiraron las membranas y se lavaron con 20 mL de Solución de lavado (PBS 1X+Tween 0.1 %). Las membranas se pueden mantener en este Buffer temporalmente o pueden dejarse secar hasta el momento en que se requieran.

5.5.4. Incubación de anticuerpos

Al finalizar la transferencia, las membranas se bloquearon con una solución de suero fetal bovino libre de ácidos grasos al 20 %, agitando continuamente durante 1 hora. Concluido el bloqueo, la solución se retiró y se colocó el primer anticuerpo (las concentraciones empleadas del primer y segundo anticuerpo se indican en la Cuadro 4) con solución astringente (PBS 1x, NaCl 0.5 M y Tween20 0.5 %). La reacción permaneció en agitación durante toda la noche a 4 °C, transcurrido este tiempo se lavó con solución astringente durante 15 min en agitación. El lavado se desarrolló por triplicado. Posteriormente se colocó el segundo anticuerpo (IgG anti conejo ligado a Peroxidasa Sigma A6154) en la proporción indicada en el Cuadro 4, respecto a la solución astringente. Las membranas con el segundo anticuerpo se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Al finalizar, las membranas se lavaron por triplicado dejándolas listas para el revelado.

Cuadro 4. Condiciones empleadas para cada anticuerpo.

1ºAnticuerpo	Dilución	2ºAnticuerpo- Dilución	Tiempo de exposición
Ciclina D4	1:3000	1:40 000	1 min
Ciclina D5;3	1:2500	1:40 000	1 min
Ciclina D2;2A	1:1000	1:40 000	1 min
CDKA	1:1000	1:40 000	1 min
PSTAIRE	1:1000	1:40 000	1 min
Ciclina A	1:1000	1:40 000	1 min

5.5.5. Revelado

Una vez que se unió el anticuerpo primario y secundario sobre la membrana, se añadió el sustrato de la enzima Peroxidasa conjugada al segundo anticuerpo. El sustrato de la enzima está conformado por Luminol y Peróxido de hidrógeno, y se añadieron en cantidades iguales, se emplearon los reactivos del Kit

Immobilon Western Millipore (Cat. No. WBKLS0100). La membrana fue colocada entre dos acetatos y expuesta a una placa fotográfica durante un minuto.

5.5.6. Restauración de la membrana

Para poder realizar la inmunodetección de otra proteína sobre la misma membrana, fue necesario restaurar la membrana; es decir, eliminar los anticuerpos primarios y secundarios que se encontraban sobre la proteína blanco. De esta manera, se puede usar la misma membrana para identificar a otra proteína utilizando un anticuerpo diferente.

La membrana fue restaurada utilizando una Solución de Restauración (Blot Restore Membrane Rejuvenation Kit, Millipore). La membrana fue puesta en Solución A durante 10 minutos con agitación; posteriormente, se retiró esta solución y se agregó la Solución B durante 15 minutos. Inmediatamente, la membrana fue lavada con Solución de lavado, 15 mL durante 5 minutos. Después de lo anterior, la membrana estuvo lista para ser utilizada en otro Western-Blot.

5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de cada prueba fueron sometidos a análisis de varianza empleando un diseño de bloques completos al azar. La separación estadística de medias se hizo mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), en todos los casos. Los análisis de varianza se realizaron con el programa estadístico de diseños experimentales de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL) versión 2.1 (Olivares, 1990).

Los datos porcentuales de las distintas pruebas se transformaron a una distribución normal empleando la relación matemática: $y = \arcsin(x)^{1/2}$, donde "y" = dato transformado y "x" = dato porcentual.

5.7. ANÁLISIS MOLECULAR

5.7.1. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN, 10 ejes embrionarios fueron molidos a un polvo fino con nitrógeno líquido y mezclado con 1 ml de reactivo de TRIzol® LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). El protocolo seguido fue el recomendado por Invitrogen. La integridad del ARN fue comprobada por electroforesis en geles de agarosa (p/v 1.5%) y teñidos con bromuro de etidio.

5.7.2. RT-PCR semiquantitativo

El ARN total obtenido a partir de 0, 12 y 24 h de germinación de ejes embrionarios de maíz fue utilizado por RT-PCR semiquantitativo para seguir su patrón de expresión. Utilizamos el One Step RT-PCR Kit (Qiagen). La mezcla principal contuvo 1 x de la mezcla reacción, 10 ng de ARN total, 0.2 mM de primer sentido, 0.2 mM de primer antisentido. Las condiciones óptimas para RT-PCR semiquantitativo fueron establecidas después de variar el número de ciclos, la concentración de ARN y de cDNA, tomando en consideración la fase exponencial de la PCR. Para obtener un marco de lectura abierto, realizamos una amplificación de PCR usando las siguientes primers (5'-3'): CycD2; 2A, sentido AAA GGA TCC ATG GTG CCG GGC TAT GAC TGC y antisentido AAA CCC GGG GAC GTC TAG TGA TCC TTC TCC. Las condiciones de RT-PCR fueron un ciclo de 54°C por 30 min y 95°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 25 s; 63°C (CycD2; 2A) por 30 s; 72°C por 1 minuto, un ciclo de 72°C por 5 min. Condiciones de RT-PCR semiquantitativas para el ARN ribosomal 18S (rRNA) fueron un ciclo de 54°C por 30 min y 94°C por 15 min, 24 ciclos de 94°C por 50 s, 56°C por 50 s, 72°C por 30 s, un ciclo de 72°C por 10 minutos; el ARN total utilizado fue de 10 ng. Los fragmentos amplificados fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa (peso/volumen 1.5%) y teñidos con bromuro de etidio.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. PRUEBAS FISIOLÓGICAS

6.1.2. Prueba de germinación normal

Los cuadrados medios derivados del análisis de varianza al que fueron sometidas las variables de la prueba de germinación, fueron significativos en todos los casos, lo cual denota que los tratamientos bajo estudio manifestaron comportamientos distintos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Cuadrados medios del análisis de varianza practicado a las variables fisiológicas.

Variable	Cuadrado Medio
PN7	156.40 **
PA7	121.13 **
SM7	136.36 **
LP	11.49 **
LR	20.48 **
LT	53.40 **
PSP	0.01 **
PSR	0.01 **
PST	0.04 **

** = Significativo ($P \leq 0.01$)

Se presentó una germinación de plántulas normales en los controles (T) de las tres variedades de maíz donde Oaxaca-711 obtuvo la mayor germinación (76 %) seguido de Cuijingo (67 %) y el que menos porcentaje de germinación tuvo fue Chalqueño (62 %) (Figura 3).

El genotipo de maíz más tolerante al tratamiento por calor húmedo con el 51 % fue Oaxaca, le sigue Chalqueño con 46 % y el más susceptible a este tipo de deterioro fue el Cuijingo que sólo generó 16 % de plántulas normales.

En la prueba de deterioro por calor seco, estadísticamente Oaxaca presentó la mayor tolerancia, generó 57 % de plántulas normales, en tanto que el genotipo Cuijingo presentó 26 % de plántulas normales con una diferencia de sólo 4 % respecto al más susceptible que en este caso fue Chalqueño (22 %), estos resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Durán (2011) y Gutiérrez (2011).

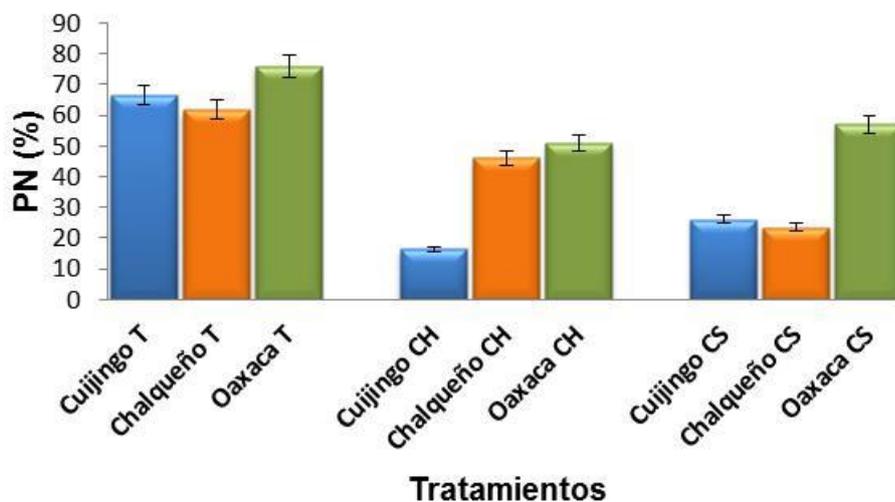


Figura 3. Plántulas normales obtenidas en la germinación de las semillas de tres variedades nativas de maíz bajo dos tratamientos de envejecimiento artificial. T=Testigos, CH=calor húmedo (41°C, 72 h y 100% h. r.) y CS=calor seco (60°C, 48 h)

En cuanto al porcentaje de plántulas anormales generadas, los controles de Cuijingo y Chalqueño presentaron un mayor porcentaje (21 %) en comparación con el genotipo Oaxaca-711, siendo este último el que produjo la menor cantidad de plántulas anormales (9 %); sin embargo, el tratamiento con CS produjo la mayor cantidad de plántulas anormales en los tres genotipos, 40 %, 49 % y 27 % en Cuijingo, Chalqueño y Oaxaca-711 respectivamente (Figura 4).

Asimismo, se observó que con CH el número de plántulas anormales fue menor comparada con el tratamiento de CS y al igual que en éste, el genotipo más susceptible fue Chalqueño (35 %) y Oaxaca-711 fue el más resistente (29 %). Cabe mencionar que la variedad Oaxaca-711 es la que tuvo el menor porcentaje de plántulas anormales en todos los tratamientos, tal como lo reportan Durán (2011) y Gutiérrez (2011).

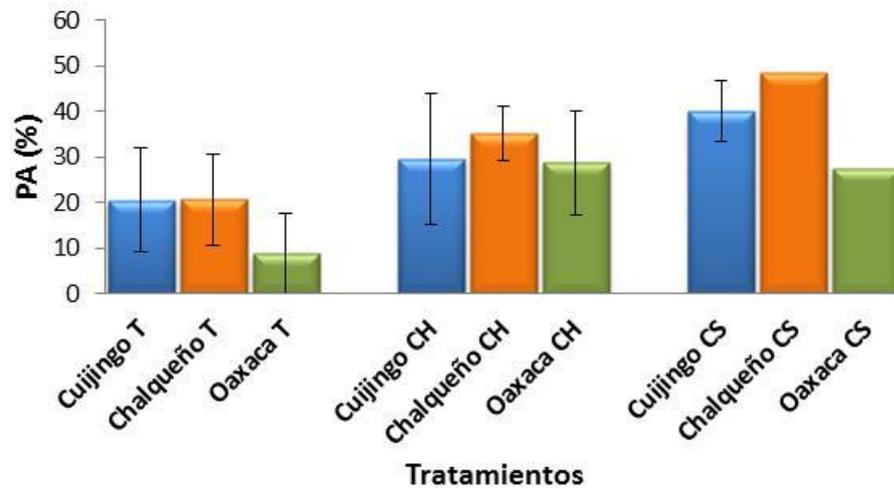


Figura 4. Porcentaje de germinación de plántulas anormales (PA %) de los 9 tratamientos a los 7 días incubación. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.

Los tratamientos con calor generaron daños significativos a las semillas (Figura 5), afectando principalmente al genotipo Cuijingo, con CH la cantidad de semillas muertas (SM) fue de 53 % y en el tratamiento con CS de 37 %. El más tolerante al tratamiento con CH fue Chalqueño con 17 %; y en el tratamiento con calor seco el genotipo más tolerante y que por ende arrojó menos porcentaje de semillas muertas fue Oaxaca con tan solo 13 %.

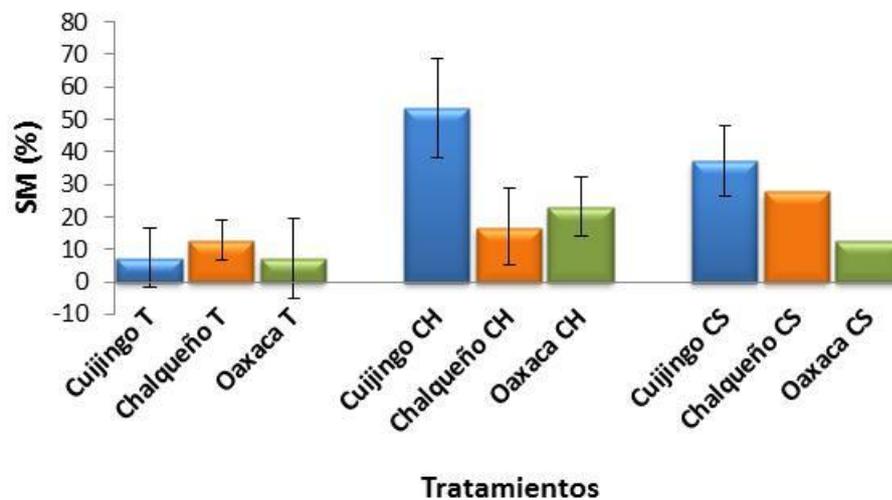


Figura 5. Porcentaje de semillas muertas (SM %) de los 9 tratamientos a los 7 días de incubación. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.

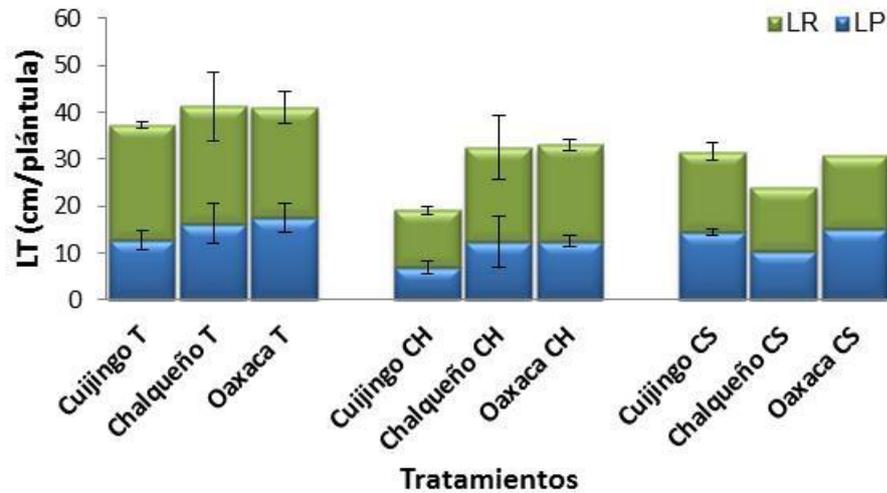


Figura 6. Longitud de plúmula (LP), radícula (LR) y total (LT) de plántulas de los 9 tratamientos. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.

Se midieron las longitudes de plúmula y radícula (en plántulas normales) y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, los controles de los tres genotipos bajo estudio presentaron una mayor longitud de radícula y plúmula (Figura 8), mientras que con los dos tipos de deterioro las dimensiones de estas estructuras disminuyeron, situación reportada por Frago *et al.* (2006) y Durán (2008).

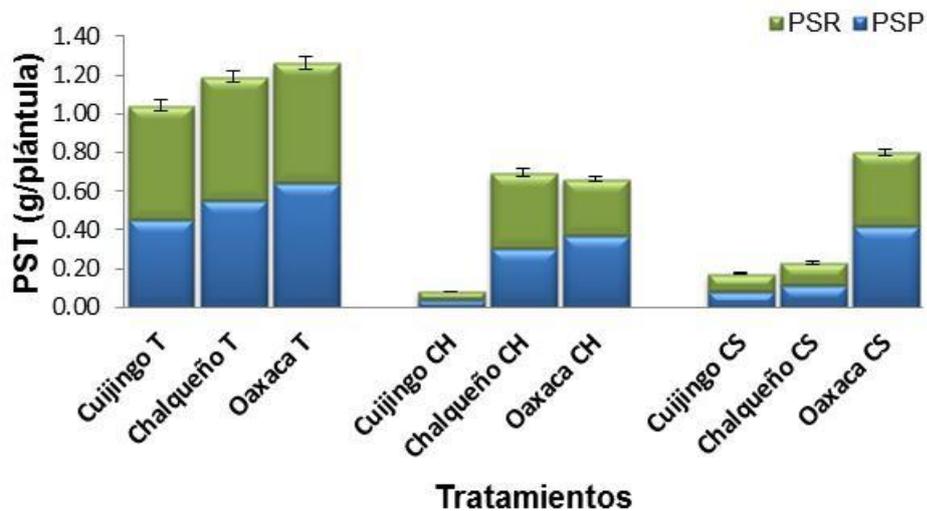


Figura 7. Peso seco de plúmula (PSP), radícula (PSR) y total (PST) de los 9 tratamientos. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.

Los daños causados por el calor húmedo fueron menores en los genotipos Chalqueño y Oaxaca presumiblemente porque involucra la rehidratación de los tejidos seminales y el agua permitió la re

funcionalización de membranas y protegió las macromoléculas implicadas en el proceso germinativo. Pero no fue así en el genotipo Cuijingo el cual mostró un desarrollo inferior en las plántulas normales formadas comparado con los otros dos genotipos. Lo cual consecuentemente repercute en el peso seco total. Sin embargo, como se observó antes (Figura 3), donde el tratamiento con calor seco afecta drásticamente a los genotipos Cuijingo y Chalqueño, pero no así a Oaxaca, ésta proporción se reflejó en la longitud de las plántulas, ya que se observó un patrón similar en el comportamiento de plántulas normales y longitud total de las mismas y, a su vez con peso seco total, donde Chalqueño y Oaxaca son los genotipos que producen más materia seca. Pero con el tratamiento con calor seco la proporción de plántulas normales del genotipo Oaxaca fue dos veces más respecto a los otros dos genotipos, sin embargo, en la longitud total de las plántulas no se conservó este comportamiento, inclusive no se observaron diferencias marcadas entre los genotipos, pero en la cantidad de materia seca, el genotipo Oaxaca sobresalió extraordinariamente respecto a los demás genotipos, teniendo hasta tres veces más materia seca con respecto a Cuijingo y Chalqueño, esto lo podemos atribuir a que las plántulas formadas por los genotipos antes mencionados son en cierta forma delgadas y las plántulas formadas por el genotipo Oaxaca son de proporciones más robustas, con un tallo más grueso y hojas más anchas, estos resultados son equiparables a los reportados por Durán (2011) y Gutiérrez (2011), lo que nos reafirma que el genotipo Oaxaca es una variedad de maíz vigorosa.

La medición de los pesos secos en una población de plántulas, se realiza para estimar su nivel de vigor, por consecuencia, los genotipos que generan mayor cantidad de materia seca se consideran de alto vigor y, esto se puede considerar como un criterio de selección en fitomejoramiento (Cano *et al.*, 2000).

6.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

6.2.1. Nivel de acumulación de proteínas

Hay ciclinas en cada fase del ciclo celular que generalmente son destruidas al terminar cada etapa. La cinasa, o enzima que fosforila proteínas, requiere de la ciclina para activarse, por lo que se denomina cinasa dependiente de ciclina o CDK; así, la desaparición de la ciclina en cada fase causa la caída en la actividad de la cinasa asociada (Pines, 1993). En células de eucariontes superiores, como las de plantas, las ciclinas de G1 se denominan ciclinas D y hay varios tipos (Quelle *et al.*, 1993, Renaudin *et al.*, 1996). Otras como las ciclinas A y B, funcionan en S/G2 y G2/M, siempre asociadas a CDKs (Renaudin *et al.*, 1996). La investigación se ha centrado en el estudio de la fase G1 y de la transición hacia la fase S durante la germinación de semillas de maíz, fases muy importantes para una germinación exitosa de las semillas (Elder *et al.*, 1987; Gutiérrez *et al.*, 1993; Vázquez y de la Paz, 2003). Se han clonado varias ciclinas D (Quiroz y Vázquez, 2006) y se ha demostrado que este tipo de proteínas se asocian a CDKs y a otras proteínas (Lara *et al.*, 2008); entre ellas destaca el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), un factor esencial que permite a las DNA polimerasas duplicar eficientemente el DNA (Prelich *et al.*, 1987). Además PCNA se asocia a complejos ciclinas-cinasas, pero su función y propósito aún son materia de estudio (Sánchez *et al.*, 2002).

Para conocer cómo se comportan las proteínas del ciclo celular se hicieron estudios de Western Blot empleando las proteínas extraídas de los ejes embrionarios de las semillas de maíz de los diferentes tratamientos.

La ciclina D5 en los tiempos del control de Chalqueño, mostró un incremento en la acumulación de la proteína a las 12 h y posteriormente disminuyó significativamente a las 24 h (Figura 10), este comportamiento concuerda con el reportado por Lara *et al.*, (2008) donde menciona que en embriones de semillas secas (0 h) se observó la presencia de la ciclina D5 solo que a bajos niveles y mostró un incremento de 2.5 veces más de la proteína a las 18 h de germinación para posteriormente mostrar una reducción a las 24 h, este patrón de comportamiento se observó también en el tratamiento con calor húmedo solo que en esta caso la ciclina D5 presentó una mayor acumulación a las 12 h respecto al control y no cae tan drásticamente su presencia a las 24 h debido a que muestra niveles de acumulación muy parecidos al tiempo cero lo cual nos indica que el tratamiento con calor húmedo no afectó a esta proteína; con calor seco a las 12 h de germinación se observó un ligero incremento en los niveles de acumulación de proteína los cuales fueron muy semejantes al testigo, pero en este caso la disminución en la presencia de la proteína a las 24 h es más notable, en la variedad Oaxaca la presencia de la proteína en los testigos mostró un incremento bastante notable a las 12 h y

posteriormente cayó a las 24 h de germinación, con el calor húmedo la Cyc D5 se vio claramente afectada ya que sus niveles de acumulación fueron disminuyendo conforme avanzó el tiempo de germinación, pero con calor seco esta proteína resultó afectada en las primeras horas de germinación ya que se observó una disminución a las 12 h pero posteriormente se incrementó notablemente, lo cual nos indicaría que esta proteína se sintetiza de novo después del efecto del deterioro. La variedad Cuijingo se afectó considerablemente por los tratamientos con calor porque los niveles de proteína disminuyeron conforme transcurrió el proceso germinativo.

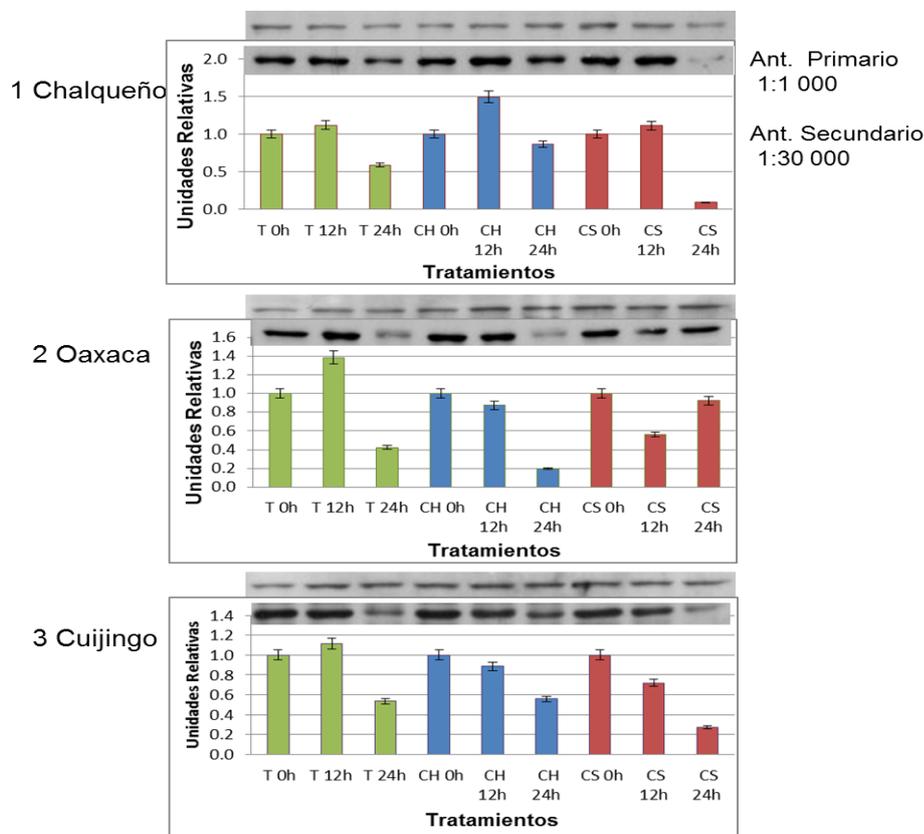


Figura 8. Western blot usando anticuerpo anti-Cyc D5 para los extractos de proteínas de ejes embrionarios de maíz a las 12 y 24 de imb. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.

La variedad Chalqueño presentó una acumulación de la Cyc A en los controles a las 12 h y se mantuvo casi estable a las 24 h, el mismo comportamiento se presentó en el tratamiento con calor húmedo, pero con calor seco esta proteína se incrementó notoriamente respecto al control a las 12 y 24h, lo que sugiere que no afectó el tratamiento con calor seco.

La variedad Oaxaca mostró una tendencia a disminuir su proteína (Cyc A) en los controles, pero en el tratamiento con calor húmedo se incrementó a las 12 h y posteriormente disminuyó a las 24 h, sólo con calor seco se vio afectada ya que mostró una tendencia a disminuir su acumulación conforme avanzó el tiempo de germinación.

En la variedad Cuijingo esta proteína mostró una disminución en los dos tratamientos conforme avanzó el tiempo de germinación respecto a los controles, demostrando que esta proteína es dañada por el calor.

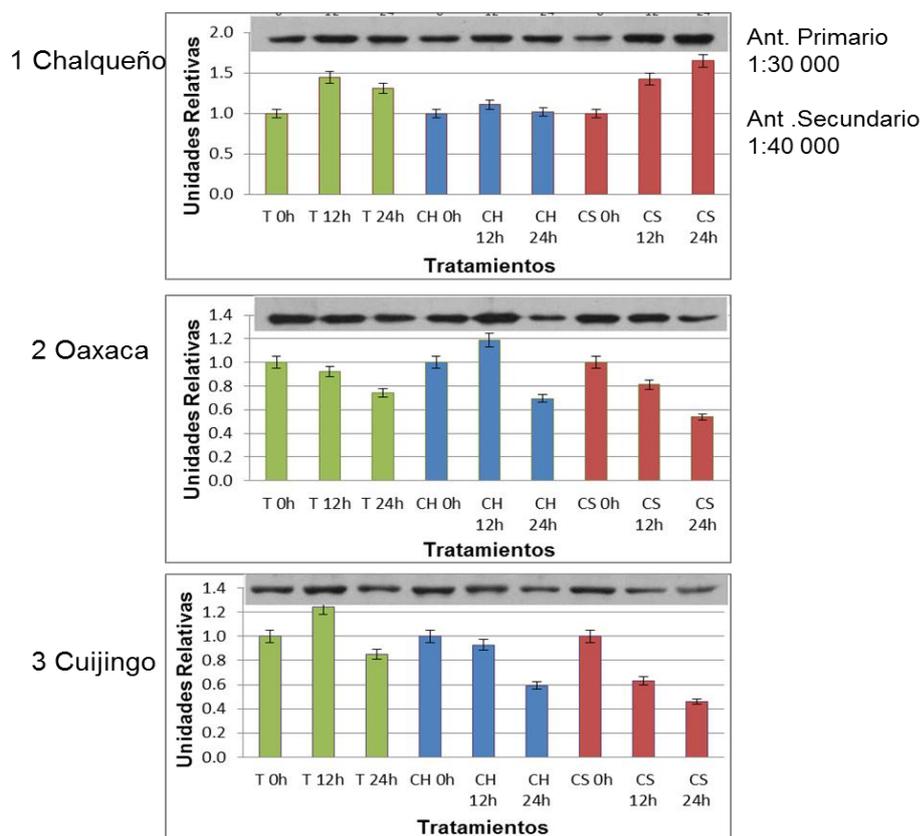


Figura 9. Western blot usando anticuerpo anti-Cyc A para los extractos de proteínas de ejes embrionarios de maíz a las 12 y 24 de imb. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.

Los controles de Chalqueño mostraron un incremento de la proteína CDKA a las 12 y 24 h de germinación (Figura 12), mismo comportamiento presentó el tratamiento con CH que mostró una acumulación mayor de proteína a las 24 h, sólo que el calor seco dañó significativamente a esta proteína en esta variedad debido a que ésta va disminuyendo en el tiempo de germinación.

La variedad Oaxaca, mostró un patrón similar al Chalqueño en los controles teniendo una acumulación hasta las 24h, el mismo comportamiento se observó en el tratamiento con calor húmedo, y con calor seco se incrementó a las 12 h y posteriormente la acumulación de la CDKA disminuyó a las 24 h, sugiriendo que la proteína es capaz de sintetizarse de novo pero no es lo suficientemente estable para permanecer después de este tiempo o posiblemente su accionar sea bastante rápido para llevar a cabo su función.

En la variedad Cuijingo, la CDKA mostró una alta resistencia al calor, ya que en el tratamiento con calor húmedo no se vio afectada, todo lo contrario tuvo un incremento en la acumulación de proteína, en calor seco

existe una disminución en la presencia de la proteína a las 12 h pero después tiene un incremento notable a las 24 h.

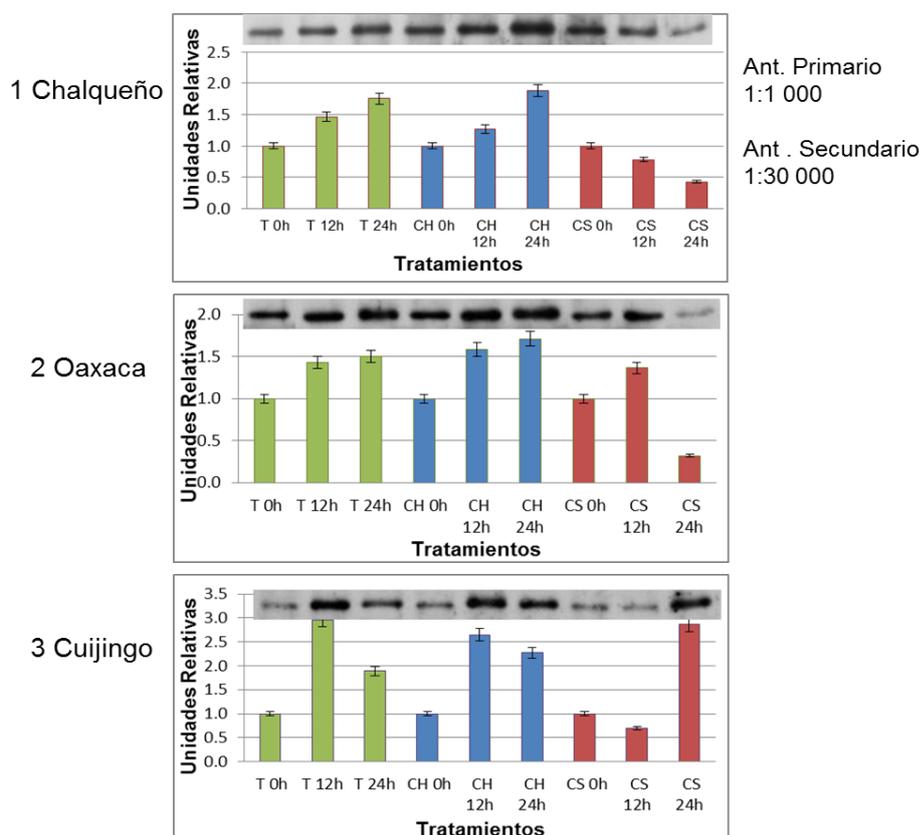


Figura 10. Western blot usando anticuerpo anti-CDKA para los extractos de proteínas de ejes embrionarios de maíz a las 12 y 24 de imb. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.

La variedad Chalqueño presentó una acumulación de la ciclina D4 en los controles a las 12 h y posteriormente cayó a las 24 h, mismo comportamiento presentó en el tratamiento con calor seco, pero con calor húmedo esta proteína disminuyó a las 12 y 24h lo que nos sugiere que no se afecta significativamente por el tratamiento con calor (Figura 13). La acumulación de la Cyc D4 en los controles de la variedad Oaxaca disminuyó en el tiempo de germinación, en el tratamiento con calor húmedo el nivel de acumulación de la Cyc D4 se permaneció casi igual a las 12 h y disminuyó a las 24 h, solo con calor seco no se vio afectada ya que mostró una tendencia a permanecer más o menos estable conforme avanzó el tiempo de germinación.

En Cuijingo la proteína Cyc D4 mostró un comportamiento similar al Chalqueño en los controles con un incremento a las 12 h y una disminución a las 24, en el tratamiento con calor húmedo hubo una tendencia a disminuir conforme avanzó el tiempo de germinación respecto a los controles, mismo patrón de acumulación presentó en el tratamiento con calor seco.

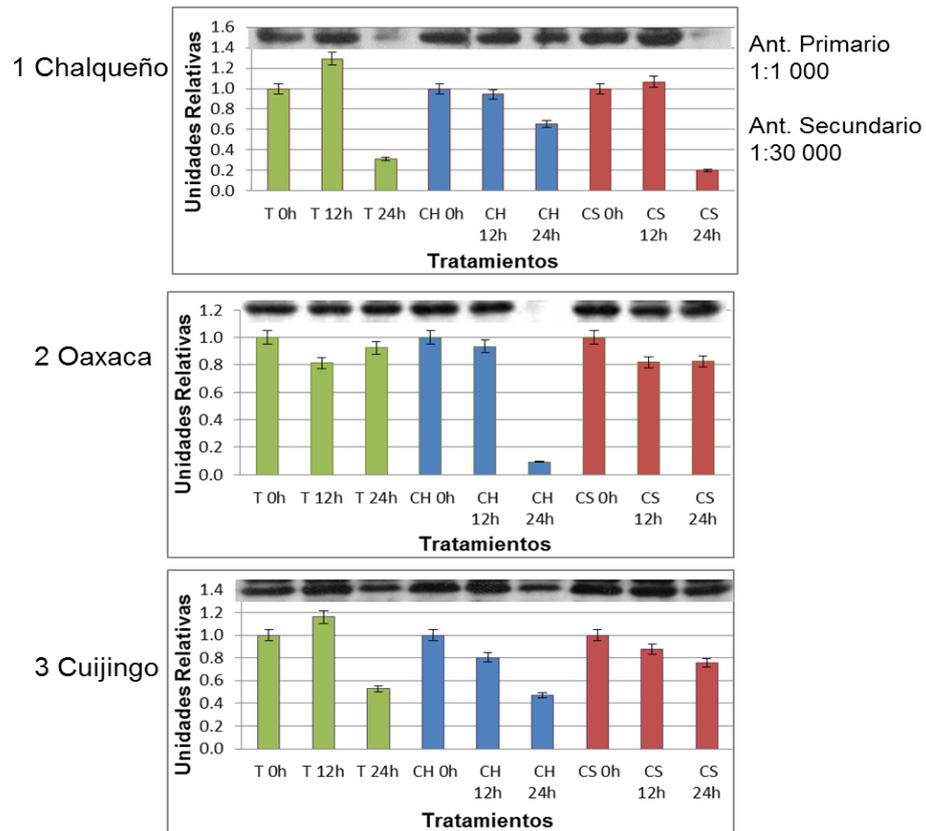


Figura 11. Western blot usando anticuerpo anti-ciclina D4 para los extractos de proteínas de ejes embrionarios de maíz a las 12 y 24 de imb. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.

La ciclina D2 fue seguida a nivel de proteína, se ha documentado que la Ciclina D2 de *Arabidopsis* es una proteína estable en la células, esta proteína está presente en semillas secas de maíz e incrementa sus niveles a las 6 horas de germinación para caer gradualmente hasta las 24 h (Gutiérrez, 2005). En la Figura 14 el Chalqueño presenta una acumulación en los controles a las 12 h y se posteriormente cae a las 24 h, mismo comportamiento presenta en el tratamiento con calor seco, pero con calor seco esta proteína se va disminuyendo respecto al control a las 12 y 24h lo que nos sugiere que con calor húmedo se afecta esta proteína.

El maíz de raza Oaxaca muestra el comportamiento reportado anteriormente por Gutiérrez (2006) donde hay una caída de las proteínas a las 24 h en el control, pero con los tratamientos con calor esta proteína se incrementa notablemente sugiriéndonos que el calor no tiene efecto negativo alguno sobre ella. En el maíz de raza Cuijingo esta proteína muestra una tendencia a disminuir en los dos tratamientos con calor conforme avanza el tiempo de germinación respecto a los controles, lo que nos dice que esta proteína es seriamente dañada por el calor

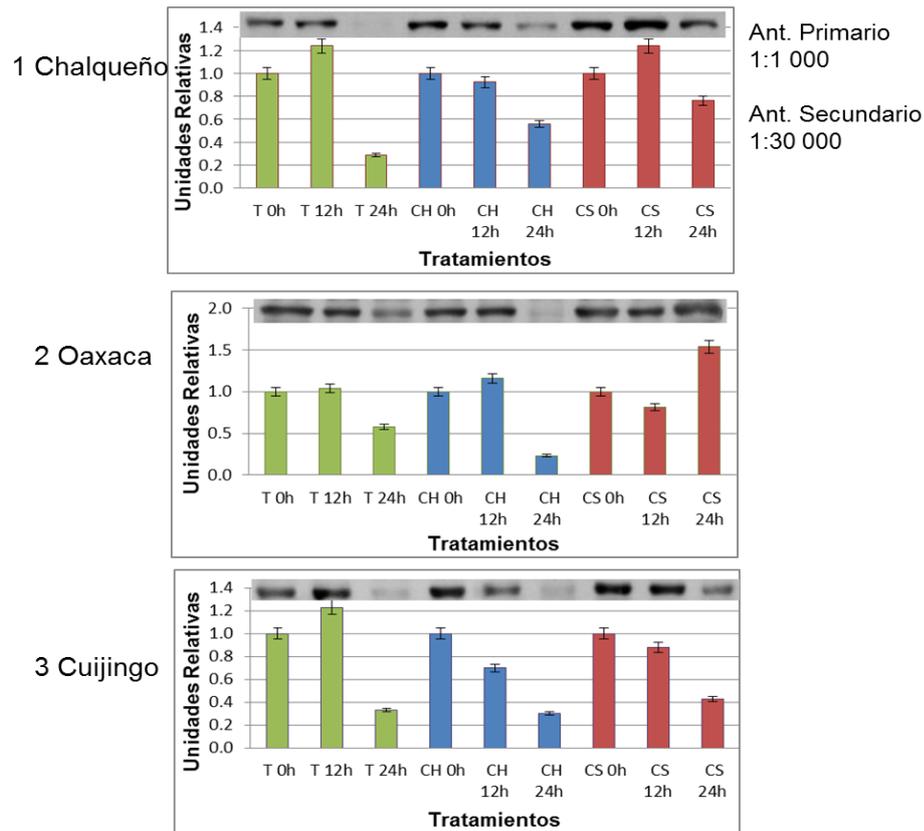


Figura 12. Western blot usando anticuerpo anti-ciclina D2 para los extractos de proteínas de ejes embrionarios de maíz a las 12 y 24 de imb. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.

El genotipo Chalqueño muestra un comportamiento de acumulación de PSTAIRE en los controles hasta las 24 h, este patrón de acumulación de esta proteína se conserva en los tratamientos con calor húmedo y seco, lo que indica que esta proteína no se afecta en este tipo de maíz.

En el maíz Oaxaca también muestra un incremento en la acumulación de la proteína a las 24 h, igual comportamiento se ve en el tratamiento con calor húmedo, indicando que este tipo de deterioro no afecta esta proteína, con calor seco se observa un incremento a las 12h y después cae por lo que se sigue que este tipo de deterioro si afecta a esta proteína.

El genotipo Cuijingo en los controles muestra un incremento en la acumulación de proteína hasta las 24 h, pero en los tratamientos con calor húmedo solo se observa una acumulación mayor a las 12 h y después cae y con calor seco esta proteína definitivamente se cae su acumulación indicando que esta proteína en este genotipo es susceptible de degradación por los tratamiento con calor.

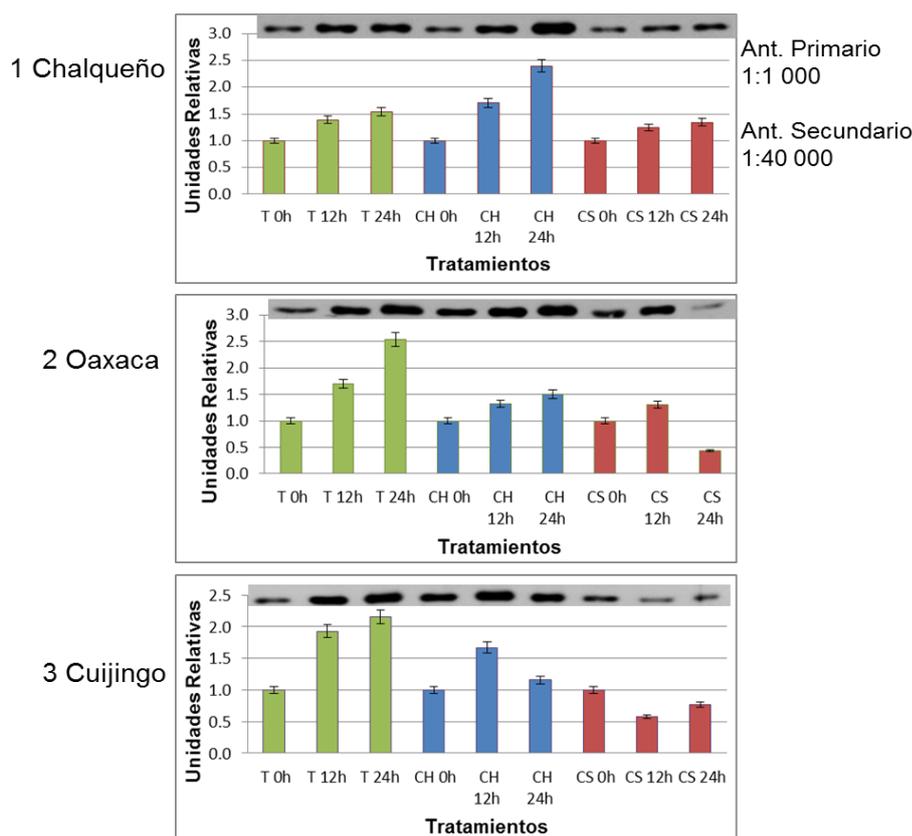


Figura 13. Western blot usando anticuerpo anti-PSTAIRE para los extractos de proteínas de ejes embrionarios de maíz a las 12 y 24 de imb. T: semillas sin envejecimiento artificial, CH: semillas sometidas a 41 °C y 100 % de humedad relativa por 72 h y CS: semillas sometidas a 60 °C por 48 h.

Durante el envejecimiento natural de la semilla de maíz se reduce el contenido total de reservas, como carbohidratos y proteínas (Basavarajappa *et al.*, 1991), que es una causa importante de los efectos en el crecimiento y desarrollo de la nueva plántula al avanzar el deterioro de la semilla. Sin embargo, Cruz-Pérez *et al.* (2003) detectaron semillas de maíz sin cambios significativos en el peso seco del endospermo, es decir, las reducciones de reservas no siempre ocurren.

La reparación de membranas celulares y del DNA y la síntesis de proteínas que usan los ARNm ocurren durante las primeras 8 a 12 h y, según Bewley (1997), la síntesis de mitocondrias y proteínas ocurre después de las 12 h, mientras que la movilización de reservas de la semilla, el alargamiento y división celular se dan después de 50 h de iniciada la imbibición. Según Bewley y Black (1994), el deterioro de las membranas en semillas se debe a una disminución de fosfolípidos, carbohidratos y proteínas, así como a la reducción en la actividad de la peroxidasa, durante el secado en la maduración. En un estudio realizado por Guy y Black (1998) se llegó a la conclusión de que los reducidos niveles de proteínas y síntesis de RNAm en el embrión de semillas de bajo vigor puede ser resultado de un retardo en la acumulación de RNAm y polipéptidos específicos que son necesarios para una germinación completa. McDonough *et al.* (2004) indican que el envejecimiento acelerado a 50 °C afectó perceptiblemente las características físicas y químicas de sorgo y

del maíz. El envejecimiento causó asociaciones entre los gránulos del almidón, la matriz de la proteína, y las membranas celulares.

Durante el envejecimiento, las áreas harinosas del endospermo llegaron a ser más corneas; mientras que el endospermo se endureció, además se desarrollaron fuertes asociaciones entre el almidón y la proteína, haciendo que el endospermo se fracturara a través de las células del endospermo en vez de a lo largo de membranas celulares, que es común para el maíz no envejecido. El envejecimiento perceptiblemente disminuyó la viscosidad del almidón, la solubilidad molecular a 85°C y el peso molecular de almidón solubilizado. La solubilidad de albúminas y de globulinas disminuyó mientras que la solubilidad de las proteínas extraídas por un agente reductor y/o en pH alcalino aumentó durante el envejecimiento. La disminución en la solubilidad y la funcionalidad del almidón y proteínas en granos envejecido parecen ser debido a la oxidación de la proteína. Esta oxidación está dada en base a las especies reactivas del oxígeno (ROS), todas las macromoléculas relevantes como son los ácidos nucleicos, lípidos membranales y proteínas son susceptibles a daño por ROS. En mutantes de *Arabidopsis* deterioradas en genes biosintéticos de vitamina E exhiben una reducción sustancial en la longevidad de la semilla, severos defectos en el crecimiento durante la germinación demostrando que la incontrolada producción de ROS puede llevar a un estrés oxidativo y a daño celular, dando como resultado en el deterioro de la semilla y en el impedimento de la germinación y del desarrollo de la plántula (Sattler et al., 2004).

En estudios en *Arabidopsis* reportados por Rajjou et al., (2008), mencionan que existe una aparente correlación entre el metabolismo de las proteínas y la traducción con la reducción del vigor de las semillas inducido por el envejecimiento artificial. Además mencionan que varias proteínas asociadas con la traducción, tales como el factor de iniciación 4A-1, el factor de elongación 1-γ2, el factor de elongación 1B-γ y la proteína ribosomal 60S, son menos abundantes en las semillas deterioradas durante la germinación. En estudios hechos por Prieto-Dapena et al., (2006) también mencionan que en semillas transgénicas hubo una sobreacumulación de un factor de transcripción a estrés por calor, el cual incrementa la acumulación de Heat Shock Proteins (HSPs), exhibiendo una mejora en las semillas en la resistencia al deterioro causado por el envejecimiento. A nivel celular, elevadas temperatura resultan en cambios en la estructura de la proteína que pueden resultar en la exposición de residuos hidrofóbicos normalmente enterrados. Como una consecuencia de la desnaturalización térmica, las proteínas pueden agregarse y cesar su función normal (Pérez, *et al.*, 2007)

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro proyecto (datos no mostrados), esto debido a que el genotipo Oaxaca presenta una mayor acumulación de proteína de la HSP 101 que es la variedad más vigorosa y la que presentó menor acumulación de la HSP 101 fue Cuijingo que es la menos vigorosa. Por lo

tanto esta proteína puede ser la que ayude a amortiguar en mayor o menor medida el efecto causado por el deterioro causado por el envejecimiento artificial, esto debido a que al actuar como chaperonas pueden proporcionar termotolerancia para prevenir la desnaturalización y la agregación de proteínas blanco ayudar así como facilitar el repliegamiento de proteínas, en este caso podrían ser las proteínas reguladoras del ciclo celular bajo estudio.

Nuestros resultados podrían indicarnos el nivel de daño ocasionado a las proteínas reguladoras del ciclo celular, esto debido a que se muestran patrones de acumulación diferentes entre los tratamientos y entre las variedades de maíz, esto podría estar asociado a la constitución genética de cada genotipo, lo cual le puede conferir una mayor o menor capacidad para amortiguar los efectos causados por los tratamientos de envejecimiento artificial. Nosotros hipotetizamos que el deterioro causado por el envejecimiento puede afectar directamente el proteoma de las semillas y por lo tanto su vigor. Analizamos si la pérdida de vigor en las semillas impuesto por el deterioro de envejecimiento resulto de la incapacidad de las semillas deterioradas para disponer de los cambios en las proteínas que normalmente acompañan a la germinación. Con todo lo mencionado anteriormente podemos asumir que una concatenación de estos eventos que suceden a nivel molecular y la respuesta genotípica de cada variedad de maíz a los tratamientos de deterioro con el envejecimiento artificial podrían ser los que nos indicarían porque tenemos respuestas diferenciales en los niveles de acumulación de proteínas de cada genotipo y con cada tratamiento en respuesta a un anticuerpo específico.

Los cuadrados medios derivados del análisis de varianza al que fueron sometidas las variables de Western Blot son significativos en todos los casos, lo cual denota que los tratamientos bajo estudio manifestaron comportamientos distintos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Cuadrados medios del análisis de varianza practicado a las variables bioquímicas.

Variable	Cuadrados Medios
CDKA	0.025 **
Cyc A	0.005 **
Cyc D4	0.023 **
Cyc D5	0.004 **
Cyc D2,2A	0.034 **
Pstaire	0.022 **

** = Significativo ($P \leq 0.01$)

6.4. ANÁLISIS MOLECULAR

6.4.1. Análisis de transcritos de genes del ciclo celular mediante RT-PCR

El nivel de expresión de las diferentes ciclinas tipo D se siguió durante un proceso de desarrollo, tal como la germinación de las semillas usando ejes embrionarios de maíz como la fuente de mRNA. Para éste propósito, se realizaron experimentos de RT-PCR para ver la expresión de genes diferentes ciclinas a lo largo del ciclo celular. Todas las muestras fueron normalizadas con respecto a la expresión del gen del RNA ribosomal 18S y a la intensidad de las bandas en ejes embrionarios de semillas secas. La expresión de la ciclina D2,2A se siguió a nivel transcripcional (Fig. 1a). En cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis thaliana*, el mRNA de la ciclina D2,2A fue expresado a muy bajos niveles y estos no fueron afectados bloqueando las células en la transición G1/S (Fuerst et al. 1996). En germinación de maíz, el mRNA de la ciclina D2,2A fue detectable en las semillas secas usadas como control, ésta expresión se incrementó notablemente a las 12 h de germinación y posteriormente los niveles cayeron a las 24 h. (Fig. 1b), éste comportamiento en la expresión fue similar en los tres genotipos de maíz: Chalqueño, Oaxaca y Cuijingo (resultados similares para maíz se han reportado antes por Gutiérrez et al., 2005, Quiroz y Vázquez, 2006). Por otra parte, el tratamiento con calor húmedo alteró este patrón, los genotipos Chalqueño y Cuijingo tuvieron un comportamiento similar que el control con un incremento notable a las 12 h y un posterior decaimiento a las 24 h, pero el genotipo Oaxaca tuvo un decremento a las 12 h y un incremento posterior a las 24 h (Fig. 1b). sin embargo, con calor seco Chalqueño y Cuijingo tuvieron un comportamiento similar, mostrando acumulación solo hasta las 24 h respecto al tiempo cero, y el genotipo Oaxaca tuvo un incremento temprano, es decir, a las 12 h pero después cayó el nivel de expresión a las 24 h de germinación (Fig. 1c).

El nivel de expresión de las diferentes ciclinas tipo D se siguió durante un proceso de desarrollo, tal como la germinación de las semillas usando ejes embrionarios de maíz como la fuente de mRNA. Para éste propósito, se realizaron experimentos de RT-PCR para ver la expresión de genes diferentes ciclinas a lo largo del ciclo celular. Todas las muestras fueron normalizadas con respecto a la expresión del gen del RNA ribosomal 18S y a la intensidad de las bandas en ejes embrionarios de semillas secas. La expresión de la ciclina D2,2A se siguió a nivel transcripcional (Fig. 8).

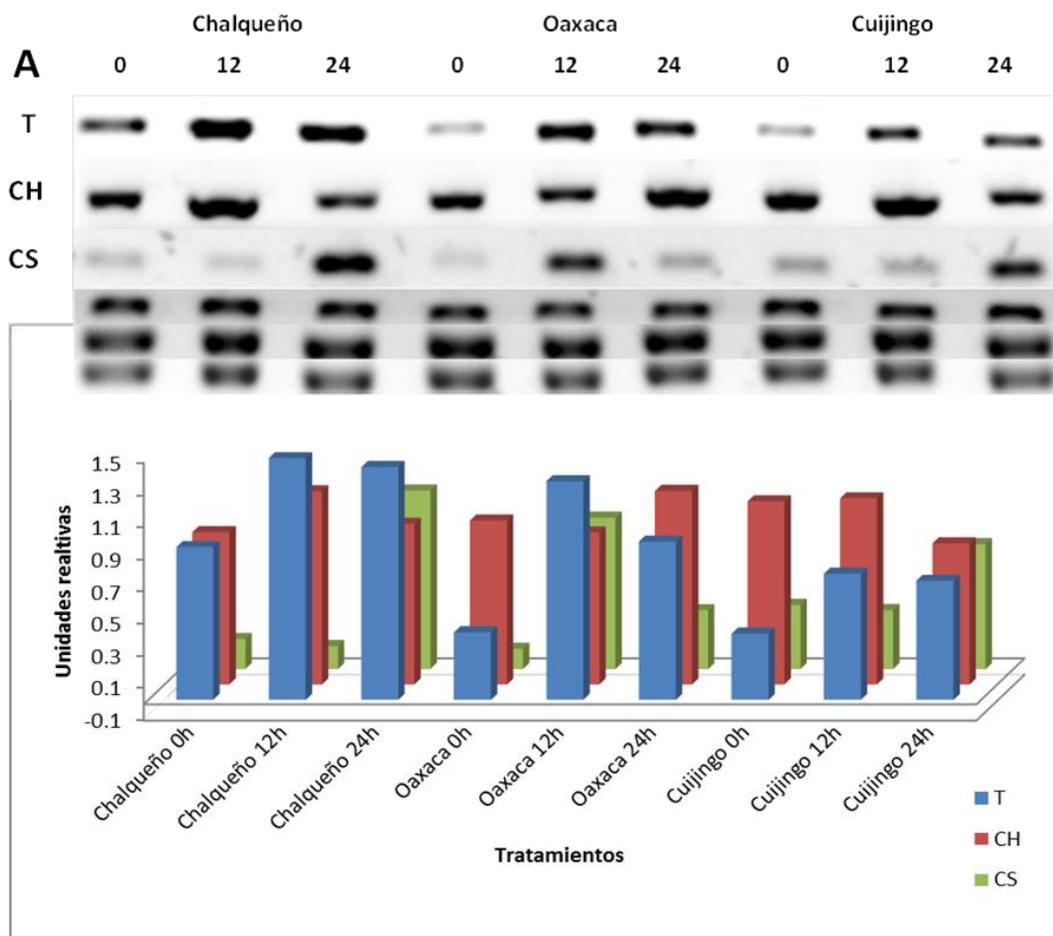


Figura 14. Expresión de mRNA de la Ciclina D2,2A durante la germinación de maíz. Los ejes embrionarios de maíz fueron embebidos por los periodos de tiempo indicados en presencia de amortiguador de imbibición. d) análisis de la densitometría relacionada a la señal con la cantidad de rRNA cargado. T, control de las semillas; CH, tratamiento calor húmedo y CS, tratamiento calor seco.

En cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis thaliana*, el mRNA de la ciclina D2,2A fue expresado a muy bajos niveles y estos no fueron afectados bloqueando las células en la transición G1/S (Fuerst et al. 1996). En germinación de maíz, el mRNA de la ciclina D2,2A fue detectable en las semillas secas usadas como control, ésta expresión se incrementó notablemente a las 12 h de germinación y posteriormente los niveles cayeron a las 24 h. (Fig. 8b), éste comportamiento en la expresión fue similar en los tres genotipos de maíz: Chalqueño, Oaxaca y Cuijingo (resultados similares para maíz se han reportado antes por Gutiérrez et al., 2005, Quiroz and Vázquez, 2006). Por otra parte, el tratamiento con calor húmedo alteró este patrón, los genotipos Chalqueño y Cuijingo tuvieron un comportamiento similar que el control con un incremento notable a las 12 h y un posterior decaimiento a las 24 h, pero el genotipo Oaxaca tuvo un decremento a las 12 h y un incremento posterior a las 24 h (Fig. 8b). En estudios realizados por Gutiérrez (2005) para la ciclina D2,2A, demostró que en la germinación de maíz el RNAm de la ciclina D2,2A no fue detectado en semillas secas o a las 3 horas de germinación, pero esta expresión se incrementó notablemente a las 6 h de germinación y después los niveles fluctuaban hasta las 24 h, imbibición en la presencia de ácido abscísico produjo un

comportamiento similar que en el control, por otra parte las citocininas alteraron el patrón de expresión debido a que se observó la presencia del RNAm a las 3h de germinación permaneciendo al mismo nivel a las 6 h y después se incrementó hasta las 24 h. demostrando que las citocininas regulan la expresión del RNAm de la ciclina D2;2A. Resultado que difiere de lo observado en cultivos de células de Arabidopsis donde la expresión del gen de la ciclina D2;2A no parece responder a este fitoregulador. (Riou-Khamlichi et al. 2000).

Sin embargo, con calor seco Chalqueño y Cuijingo tuvieron un comportamiento similar al mostrado por los tiempos control, mostrando acumulación solo hasta las 24 h respecto al tiempo cero, y el genotipo Oaxaca tuvo un incremento temprano, es decir, a las 12 h pero después cayó el nivel de expresión a las 24 h de germinación (Fig. 8b)

Durante la germinación de maíz, la fase S comienza aproximadamente a las 12 h de imbibición, tiempo en el cual se incrementa la síntesis de DNA (Baíza et al. 1989, Reyes et al. 1991) y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (Herrera et al. 2000). Mientras que las células en fase M son visibles después de 28 h de germinación, cuando comienza la protrusión radicular (Baíza et al. 1989), esto sugiere que durante la germinación la cyc D2;2A de maíz es expresada principalmente durante la fase G1 o en la transición de G1/S en el control de los tres genotipos de las semillas.

Sin embargo, con calor húmedo el patrón de expresión de la cyc D2;2A fue diferente entre los genotipos; Chalqueño y Cuijingo tuvieron el mismo patrón de expresión con respecto a los controles, estos genotipos tuvieron un modesto incremento a las 12 h y después tiende a disminuir a las 24 h pero el genotipo Oaxaca tuvo un patrón de expresión diferente con un decremento a las 12 h y después se incrementó notablemente a las 24 h, este resultado sugiere que durante la germinación de semillas de maíz tratadas con calor húmedo, la cyc D2;2A es expresada principalmente en G1 o en la transición G1/S en los genotipos Chalqueño y Cuijingo y en el genotipo Oaxaca la expresión de la cyc D2;2An está dada en la transición S/G2. En contraste, el patrón de expresión el tratamiento con calor húmedo fue completamente opuesto, en este caso en los genotipos Chalqueño y Cuijingo el gen de la Cyc D2,2A es expresada principalmente en la transición S/G2 y en el genotipo Oaxaca el gen de la Cyc D2,2An fue expresada en G1 o en la transición G1/S. Nuestros resultados indican que el patrón de expresión de la Cyc D2;2Am está en función de su vigor, determinado genéticamente presumiblemente en respuesta al envejecimiento artificial.

Diferencias observadas en el incremento en la expresión de la ciclina D2;2A puede ser debido a variaciones entre lotes de semillas usados.

7. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos según los procedimientos antes descritos, y al análisis y la discusión de los mismos, se derivaron las siguientes conclusiones:

Las variedades de maíz bajo estudio son genéticamente diferentes entre sí, por lo que su desempeño germinativo varió, así como la formación de plántulas y su grado de tolerancia al envejecimiento.

Las variedades criollas de maíz azul manifestaron diversos grados de tolerancia al deterioro artificial de sus semillas, destacando Oaxaca-711, por ser las más tolerantes, seguida de Chalqueño y Cuijingo.

Los resultados de las evaluaciones fisiológicas y bioquímicas mostraron que el deterioro ocasionado, ya sea, por calor húmedo o calor seco, ocasionó daños notables a las semillas, inclusive al nivel de proteínas, lo que repercutió en pérdida de vigor y viabilidad en las semillas.

La variedad Oaxaca fue la más tolerante al deterioro artificial, debido a que presentó mayor porcentaje de plántulas normales y mayor cantidad de materia seca en los tratamientos.

Los tratamientos con calor repercutieron sobre la acumulación de las proteínas reguladoras del ciclo celular, encontrándose patrones de acumulación diferentes entre variedades y entre tratamientos en la misma variedad

Los resultados obtenidos por WB, muestran que en el tratamiento con CH, los posibles marcadores bioquímicos serían; Para Chalqueño: CDKA, PSTAIRE, CYC D5 y CYC A.; para Oaxaca: CDKA, PSTAIRE, CYC D2, CYC D5 y CYC A y para Cuijingo: CDKA .

Los resultados obtenidos por WB, muestran que en el tratamiento con CS, los posibles marcadores bioquímicos serían; Para Chalqueño: PSTAIRE, CYC D2 y CYC A.; para Oaxaca: CYC D2, CYC D5 y CYC D4 y para Cuijingo: CDKA y CYC D4

8. REFERENCIAS

- Abascal, J. (1984). Manual de métodos de ensayo de vigor. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- Anderson, J. D. (1973). Metabolic changes associated with senescence. *Seed Sci. and Technol.* 1: 401-406.
- Andrade, H. J. (1991). Mejoramiento del vigor en semillas de maíz y su relación con la emergencia y el rendimiento. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México.
- Antonio, M. M; Arellano, V. J. L; García S. G; Mirada, C. S; Mejía, C. J. A; González, C. F. V. (2004). Variedades criollas de maíz azul raza chalqueño. Características Agronómicas y calidad de semillas. *Rev. Fitotec. Mex.* 27(1): 9-15.
- Baíza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M. and Sánchez de Jiménez, E. (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* 135: 416–421
- Barroco, R.M., Van Poucke, K., Bergervoet, J.H.W., De Veylder, L., Groot, S.P.C., Inze, D., and Engler, G. (2005). The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. *Plant Physiol.* 137, 127–140.
- Bartek, J., Lukas, C. y Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 792-804
- Basavarajappa, B. S; Shetty, H. S. and Prakash, H. S. (1991). Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seed. *Seed Sci. and Technol.* 19: 279-286.
- Beltrán, F. J; Bockholt, A. J; Rooney, L. (2001). Blue corn. In: Specialty Corns. A.R. Hallauer (ed). Iowa State University. Ames Iowa, USA. pp: 293-337.
- Bewley, J.D. (1982). Protein and nucleic acid synthesis during germination and early seedling growth. In *Encyclopaedia of Plant Physiology*, Vol. 14A, D. Boulter and B. Parthier, eds (New York: Springer-Verlag), pp. 61-81.
- Bewley, J. D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Bewley, J. D. and Black, A. M. (1994). *Seeds: Physiology of Development and Germination*. 2nd Plenum Press. N. Y. USA. 445 p.
- Bommer, D. F. R. (1991). The historical development of international collaboration in plant genetic resources. In. Th. J.L. van Hintun, L. Frese, and P.M. Peerer (eds.), *Searching for New Concepts for Collaborative Genetic Resources Management: Papers of the EUCARPIA/IBPGR Symposium*. International Board for Plant Genetic Resources. pp. 3-12.

- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Breyne, P., Dreesen, R., Vandepoele, K., De Veylder, L., Van Breusegem, F., Callewaert, L., Rombauts, S., Raes, J., Cannoot, B., Engler, G., Inzé, D. y Zabeau, M. (2002) Transcriptome analysis during cell division in plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 12: 14825-14830.
- Cano, R. P; Ramírez, R. G; Ortegón, P. J; Esparza, M. J; Rodríguez, H. S. (2000). Análisis dialéctico para vigor de semilla en melón. *Agrociencia.* 34(3): 337-342.
- Ching, T. M. (1973). Biochemical aspects of seed vigor. *Seed Sci. and Technol.* 1(1): 73-88..
- Colasanti, J., Tyers, M. y Sundaresan, V. (1991) Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34^{cdc2} homologue from *Zea mays*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 3377-3381.
- Cruz, G, F. (1995). El metabolismo del DNA y el vigor de semillas de maíz. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, México. 79 p.
- Delgado, G. C. (2003). Energía, sistema alimentario moderno y salud. El Catoblepas. Volumen (19): 15. Disponible en: <http://www.nodulo.org/ec/index.htm>. Consultado el: 28 de Marzo de 2007.
- Delouche, J. C. (1976). Germinación, Deterioro y Vigor de semillas. *Seed News*, Mississippi State University
- Desvoves, B., Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Chua, N-H. y Gutierrez, C. (2006) Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during Arabidopsis leaf Development. *Plant Physiol.* 140: 67-80.
- De Veylder, L., Engler, J. D., Burssens, S., Manevski, A., Lescure, B., Van Montagu, M., Engler, G. y Inzé, D. (1999) A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordial formation. *Planta* 208: 453-462.
- De Veylder L, Joubès J, Inzé D (2003) Plant cell cycle transitions. *Curr Opin Plant Biol* 6: 536–543
- Dewitte W, Murray JAH (2003) The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* 54: 235–264
- Dickerson, G. W. (1990). Blue Corn Production and Marketing in New Mexico. Co-op Ext. Serv. Guide H-226. p 294.
- Dickerson, G. W. (2003). Nutritional Analysis of New Mexico Blue Corn and Dent Corn Kernels. Co-op Ext. Serv. Guide H-233. p 1-2.
- Dobzhansky, T. (1982). Genetics and the Origin of Species. Columbia University Press. Series: The Columbia Classic in Evolution. New York. 364 p.
- Durán, D. 2008. Caracterización fisiológica y molecular de semillas de maíz azul. Tesis de Maestría en Ciencias. UPIBI-IPN. 98p
- Durán-Hernández, D; Gutiérrez-Hernández, G. F; Arellano-Vázquez, J. L; García-Ramírez, E. y Virgen-Vargas, Juan. (2011). Caracterización molecular y germinación de semillas de maíces criollos azules con envejecimiento Acelerado. *Agronomía mesoamericana.* 22(1):11-20

- Elder, R. H; Osborne, D. J. (1993). Function of DNA synthesis and DNA repair in the survival of embryos during early germination and dormancy. *Seed Sci. Res.* 3: 43-43.
- Fay, A.M., McDonald, M. B. y Still, S. M. (1993). Vigor Testing of *Rudbeckia fulgida* Seeds. *Seed Sci. and Technol.* 21:2, 453-462.
- Fragoso, P. E. M; Gutiérrez, H. G. F; Virgen-V, J. (2006). Repercusiones físicas y fisiológicas del envejecimiento natural de semillas de cruzas simples de maíz y sus líneas progenitoras. *Rev. Fitotec. Mex.* 29: 75-80.
- Fuerst, R.A.U., Soni, R., Murray, J.A.H. y Lindsey, K. (1996) Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 112: 1023-1033.
- Gutiérrez, G; Cruz, F; Moreno, J; González-Hernández, V. A; Vázquez-Ramos, J. M. (1993). Natural and artificial seed ageing in maize: germination and DNA synthesis. *Seed Sci. Res.* 3: 279-285.
- Gutiérrez, R., Quiroz-Figueroa, F. y Vázquez-Ramos, J.M. (2005) Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiol.* 46: 166-173.
- Gutiérrez-Hernández, G. F; Vázquez-Ramos, J. M; García-Ramírez, E; Franco-Hernández, M. O; Arellano-Vázquez, J. L. y Durán-Hernández, D. (2011). Efecto del envejecimiento artificial de semillas de maíces criollos azules en su germinación y huella genómica. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 34 (2): 77 - 84
- Guy, P. A. and Black, M. (1998) Germination-related proteins in wheat revealed by differences in seed vigour. *Seed Sci. Research* (1998), 8: 99-112
- Hampton, J. G. and Coolbear, P. (1990). Potential versus actual seed performance can vigour testing provide an answer? *Seed Sci. and Technol.* 18 (1): 215-228.
- Harborne, J. B; Gavazzi, G. (1969). Effect of Pr and pr alleles on anthocyanins biosynthesis in Zeal Mays. *Phytochemistry* 8: 999-1001.
- Hashimoto, J., Hirabayashi, T., Hayano, Y., Hata, S., Ohashi, Y., Suzuka, I., Utsugi, T., Toh-E, A. y Kikuchi, Y. (1992) Isolation and characterization of cDNA clones encoding *cdc2* homologues from *Oryza sativa*: a functional homologue and cognate variants. *Mol. Gen. Genet.* 12: 865-876.
- Hartwell, L.H. y Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* 246: 629-634.
- Herrera, I; Sanchez, M. P; Molina, J; Plasencia, J. and Vázquez-Ramos, J. M. (2000). Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* 110: 127-134
- Heydecker, W. (1972). Vigour. Syracuse University Press, 259-252.
- ISTA (Internacional Seed Testing Association). 2001. International rules for seed testing 2001. *Seed Sci. and Technol.* 29. Supplement 2. 28-29 p.
- Ito, M., Criqui, M-C., Sakabe, M., Ohno, T., Hata, S., Kouchi, H., Hashimoto, J., Fukuda, H., Komamine, A. y Watanabe, A. (1997) Cell cycle regulated transcription of A- and B-type plant cyclin genes in synchronous cultures. *Plant J.* 11: 983-992.

- Joubés, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inzé, D., Umeda, M. y Renaudin, J.P. (2000) CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* 43: 607-620
- Kato, T.A., C. Mapes, L.M. Mera, J.A. Serratos, R.A. Bye. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 116 pp. México, D.F.
- Lara-Núñez A, de Jesús N, Vázquez-Ramos, J. M. (2008). Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol Plant.* 132:79–88
- McDonald, M. B. (1995). Standardization of seed vigour test. pp 88-97. In H. A. Van de Venter (ed.). *ISTA seed vigour testing seminar*. Copenhagen, ISTA.
- McDonald, M. B. (1998). Seed quality assessment. *Seed Sci. Res.* 8: 265-275.
- McDonald, M. B. (1999). Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci. and Technol.* 27: 177-237.
- McDonald, M. B. 2002. Standardization of Seed Vigor Test. p 200 – 208. In: McDonald, M.B., y S. Contreras (ed). *Seeds: Trade, Production and Technology*. Proceedings Internacional Seed Seminar. Colección de Extensión. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. 15 – 16 Octubre. Santiago. Chile.
- McDonough, C. M; Floyd, C. D.; Waniska, R. D. and Rooney, L. W. (2004). Effect of accelerated aging on maize, sorghum, and sorghum meal. *J. Cereal Chem.* 39:351-361
- Marcos-Filho, J; McDonald, M. B. (1998). Sensitivity of RAPD analysis, germination and vigour test to detect the intensity of deterioration of naturally and artificially aged soybean seeds. *Seed Sci. and Technol.* 26: 141-157.
- Meijer, M. y Murray, J.A.H. (2001) Cell cycle controls and development of plant form. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 44-49.
- Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W. y Murray, J.A.H. (2002) Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277: 41987-42002
- Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M. y Inzé, D. (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants: the nexus. *Plant Cell* 11: 509-521.
- Nurse, P. (1994). Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79: 547–550
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO/STAT). Central de datos estadísticos de consumo. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/345/default.aspx> Consultado el: 22 de Noviembre de 2010.
- Paliwal, R. L. (2001) Colección FAO: Colección y protección vegetal. <http://www.fao.org/docrep/003/X7650S/x7650s13.htm>
- Pérez, F., Carballo, A., Santacruz, A., Hernández, A., y Molina, J. (2007) Calidad fisiológica en semillas de maíz con diferencias estructurales. *Agric. Téc. Méx.* 33 (1):53-61

- Perry, D. A. (1977). A vigor test for seeds of barley (*Hordeum vulgare*) based on measurement on Plumule growth. *Seed Sci. and Technol.* 5: 709-719.
- Perry, D.A. (1983). El concepto de vigor de semilla y su relevancia con respecto a las técnicas de producción de semilla. *In: Producción moderna de semillas.* P.D. Hebblethwaite (ed.). Tomo II. Editorial Agropecuario Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay. pp: 693-701.
- Perry, D.A. (1984). Manual de Métodos de Ensayos de Vigor. Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. España.
- Pines, J. 1993. Cyclins and cyclin-dependent kinases: Take your partner. *Trends in Bioch. Sci.* 18: 195-197.
- Popinigis, F. (1977). Fisiología da semente. Brasília. 2ª Ed. 289p
- Powell, A. A. (1995). The controlled deterioration test. *In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 24.* Copenhagen. Seed vigour testing: contributions to a seminar. Zurich: International Seed Testing Association, 1995. p. 73-87
- Prelich, G.; Tan, C. K.; Kostura, M.; Mathews, M.B.; So, A.G.; Downey, K.M. and Stillman, B. (1987). Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase delta auxiliary protein. *Nature* 326, 517–520
- Prieto-Dapena, P; Castano, R; Almoguera, C and Jordano, J. (2006). Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiology.* 142:1102-1112
- Quelle, D.E; Ashmun, R.A; Shurtleff, S.S; Kato, J; Bar Sagi, D; Roussel, M.F. and Sherr. C.J. (1993). Overexpression of mouse D-type cyclins accelerate G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes and Develop.* 7: 1559-1571.
- Quiroz-Figueroa, F. and Vázquez-Ramos, J.M. (2006) Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiologia Plantarum* 128:556–568
- Rajjou, L; Lovigny, Y; Groot, S.P; Belghazi, M; Job, C. and Job, D. (2008) Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*. A comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiology,* 148: 620–641
- Reichheld, J-P., Chaubet, N., Shen, W.H., Renaudin, J-P. y Gigot, C. (1996) Multiple A-type cyclins express sequentially during the cell cycle in *Nicotiana tabaccum* BY2 cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93: 13819-13824.
- Renaudin, J.P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inze, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M., Savoure, A., Sorrell, D.A., Sundaresan, V. y Murray, J.A.H. (1996) Plant cyclins: A unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organisation. *Plant Mol. Biol.* 32: 1003-1018.
- Reyes, J; Jiménez-García, L.F; González, M and Vázquez-Ramos, J. M. (1991) Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Sci Res.* 1: 113-117
- Riou-Khamlichi, C; Huntley, R; Jacqmard, A. and Murray, J. A. H. (1999). Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science.* 283: 1541-1544

- Rossi V, Varotto S (2002) Insights into the G1/S transition in plants. *Planta* 215: 345–356
- Sako, Y; McDonald, M. B; Fujimura, K; Evans, A. F. y Bennett, M. A. (2001). A System for Automated Seed Vigour Assessment. *Seed Sci. and Technol.* 29, 625-636.
- Salinas, M. Y; Soto H. M; Martínez B. F; González, H. V; Ortega, P.R. (1999). Análisis de antocianinas en maíces de grano azul y rojo provenientes de cuatro razas. *Rev. Fitotec. Mex.* 22. 161-167.
- Sandoval, Z. H. (1995). Agotamiento de sustancias de reserva: una prueba para medir el vigor de la semilla. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 34 p.
- Sánchez, M.P., Torres, A., Boniotti, M.B., Gutierrez, C. y Vázquez-Ramos, J.M. (2002) PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biol.* 50: 167-175.
- Sattler, S.E., Cahoon, E.B., Coughlan, S.J., and DellaPenna, D. (2003). Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiol.* 132, 2184–2195
- Sorrell, D.A., Combettes, B., Chaubet-Gigot, N., Gigot, C. y Murray, J.A.H. (1999) Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiol.* 119: 343-351.
- Sysmex-Life science. (2011). Bases moleculares del cell cycle profiling. Disponible en: <http://www.sysmex-lifescience.com/Cell-Cycle-Profiling-182-4.html>. Consultado el: 8 de junio de 2011.
- Takeda, D.Y. y Dutta, A. (2005). DNA replication and progression through S phase. *Oncogene* 24: 2827-2843.
- Tekrony, D.M. (1995). Accelerated ageing. In H. A. Van de Venter (ed.). *ISTA seed vigour testing seminar*. Copenhagen, ISTA. pp 33-72
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S. y Inés, D. (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 903-916.
- Vavilov, N. I. (1951). The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants. Translated from the Russian by K Star Chester. The Roland Press Co. New York. 94 p.
- Vázquez, R. J. y de la Paz, S. M. (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research.* 13: 113-130
- Vázquez, R. J. (2006). El ciclo celular: modelos animales y vegetales. Mensaje Bioquímico, Vol. XXX, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF. Disponible en: <http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>
- Villaseñor, H. E. (1984). Factores genéticos que determinan el vigor en plántulas de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias, especialidad Genética. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, México. 149 p.
- Virgen, V. J. (1983). Evaluación del vigor en maíz (*Zea mays L.*) en base a características de semillas y plántulas. Tesis Profesional Facultad de Estudios Superiores Cuatitlán. UNAM. México. 90p

- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., de Pamphilis, W. y Ma, H. (2004) Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol.* 135: 1084-1099.
- Wellhausen, E. J; Roberts, L. M; Hernández X. E; Mangelsdorf, P. C. (1951). Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución. In. Xolocotzia. Obras de Efraín Hernández Xolocotzi. Revista de Geografía Agrícola. Tomo II. Universidad Autónoma Chapingo.
- Wilkes, H. G. (1977), Hybridization of maize and teosinte, in Mexico and Guatemala and the improvement of maize. *Economic Botany.* 31:254-293.
- Wilson, D. O. and McDonald, M. B. (1986). The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Sci. and Technol.* 27: 177-237.