Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Reacciones de deterioro de semillas: aspectos fisiológicos, químicos y ultraestructurales

Maroder, Horacio Luis

2008

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Maroder, Horacio Luis. (2008). Reacciones de deterioro de semillas: aspectos fisiológicos, químicos y ultraestructurales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Maroder, Horacio Luis. "Reacciones de deterioro de semillas: aspectos fisiológicos, químicos y ultraestructurales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

REACCIONES DE DETERIORO DE SEMILLAS DE SAUCE: ASPECTOS FISIOLÓGICOS, QUÍMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES

TESIS DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES EN EL ÁREA INDUSTRIAS

LICENCIADO HORACIO LUIS MARODER

Dirección: Dras. María del Pilar Buera y Sara Maldonado

Lugares de trabajo:

Departamento de Industrias-FCEN-UBA

Instituto de Recursos Biológicos-INTA-Castelar

Año 2008

Agradezco a quienes de una u otra manera, han hecho posible este trabajo:

Las Directoras de la tesis Dras. Maria del Pilar Buera y Sara Maldonado,

El Director del Centro de Recursos Biológicos Dr. Roberto Casas

Gonzalo y Ester, del Laboratorio de Conservación de Germoplasma (IRB-INTA-Castelar).

María del Carmen del Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA

Carolina y Silvia del Laboratorio de Propiedades Físico-Químicas y Conservación de Biomoléculas del Departamento de Industria, FCEN-UBA.

Emilio, Monica y Graciela de la Cátedra de Física del Departamento de Fisicomatemática, FFyB - UBA.

Dedico este trabajo a Imelda, por su apoyo desde lo afectivo y su ayuda desde lo intelectual para alcanzar este objetivo. Ella inició conmigo el camino de las investigaciones sobre conservación de las semillas, entre tantos otros caminos de la vida,

Lo dedico también a Florencia, Fernando, Victoria, Guillermo, Santiago y Valentina porque el afecto de todos ellos, me alienta a continuar, y a Gustavo y Javier siempre presentes en mi memoria.

Alguna vez, en algún lugar, Jorge Luis Borges dijo “Publicar es dejar de corregir”. Recuerdo estas palabras cada vez que decido darle punto final a un estudio……

ÍNDICE

RESUMEN……..…… …1

PALABRAS CLAVES Y ABREVIATURAS..……..2

ABSTRACT …….3

KEYWORDS……..……..…….....4

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN…….....5

Capítulo 2. MATERIAL Y MÉTODOS…….....10

Capítulo 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.I.- EL COMPORTAMIENTO DE LAS SEMILLAS DE SAUCE EN RELACIÓN AL SECADO, LA TEMPERATURA Y LA HUMIDIFICACIÓN.....…….…28

3.II.- ESTUDIOS HISTOQUÍMICOS Y SUBCELULARES EN SEMILLAS DE *SALIX ALBA, SALIX MATSUDANA, SALIX NIGRA* Y *POPULUS NIGRA* …… 39

3.III.- REACCIONES QUÍMICAS DE DETERIORO EN LAS SEMILLAS SECAS……52

3.IV.-REVERSION DEL DETERIORO DURANTE LA IMBIBICIÓN DE LAS SEMILLAS ENVEJECIDAS..76

3.V.- CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL CONTENIDO CELULAR……..……87

- TRANSICIONES VÍTREAS……..88
- MOVILIDAD MOLECULAR……..……...95
- ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA Y NITROGENO……..…100

Capítulo 4. CONCLUSIONES……..……..…..111

Capítulo 5. BIBLIOGRAFÍA……...113

RESUMEN

Las semillas de las especies de sauce toleran la deshidratación a contenidos de agua similares a los de una semilla ortodoxa, pero pierden la viabilidad en unas pocas semanas a temperatura ambiente. Otra característica atípica es que los cloroplastos de los tejidos embrionarios de las semillas maduras conservan el sistema de endomembranas (tilacoides) aparentemente intacto y retienen la clorofila. En el marco de las investigaciones que se realizaron en el transcurso de esta tesis surgieron, junto a los resultados mencionados, otros que muestran los mecanismos que podrían estar involucrados en el deterioro y su reparación:

1. La luz, a través de la clorofila induce un intenso daño fotooxidativo mediados por radicales libres que se evaluó por el daño a ácidos grasos, proteínas, pigmentos lo que produjo principalmente la destrucción de las membranas tilacoides.

2. Se postula que dichas membranas que contienen clorofila, proteínas y pigmentos sería el lugar en el que se inicia el ataque fotooxidativo, el que se propagaría a otras estructuras, lo que se comprobó por evaluación de alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática.

3. Si bien el ataque fotooxidativo es importante este queda mayormente restringido a los tejidos superficiales de la semilla, sin afectar sensiblemente la yema apical.

4. El daño a los tejidos superficiales determina que en las pruebas de germinación, el porcentaje de plántulas anormales sea inusitadamente elevado (disminución de la germinación normal), mientras que el porcentaje de plántulas vivas resultó sólo ligeramente menor que el que ocurre en oscuridad.

5. Las semillas que originan plantas anormales como consecuencia del ataque fotooxidativo muestran una notable recuperación de la germinación normal y de los daños metabólicos y estructurales antes mencionados, cuando se someten a humidificación.

6. Descartada la presencia de clorofila como causa importante de la mortalidad, quedan sólo dos reacciones a las que se consideran principales responsables del decaimiento de las semillas secas como son las reacciones de Maillard y de autooxidación. La primera no acompañó el descenso de la germinación total, pero si la segunda, por lo que quedaría la autooxidación como causa del rápido deterioro.

7. El ítem 6 lleva a considerar que la autooxidación en estas semillas debe ser mas activa que en otras que como estas, toleran la desecación, pero son mucho más longevas.

8. Ello podría deberse a que el estado del contenido celular presentó una mayor movilidad molecular y sea más poroso, lo que facilitaría la difusión del oxígeno, uno de los reactantes de la autooxidación. La mayor porosidad al facilitar la difusión del oxígeno y una mayor superficie lipídica atacable por ese agente debido a la desdiferenciación incompleta de las membranas, serían las causas iniciales del rápido deterioro de estas semillas.

Palabras claves: clorofila, cloroplastos, endomembranas, especies reactivas de oxigeno (ROS), fotooxidación, germinación anormal, germinación normal, germinación total, isotermas de sorción, longevidad, membranas tilacoides, movilidad molécular, permeabilidad de membrana plasmática, peroxidación lipídica, porosidad, *priming*, radicales libres, resonancia de espín electrónico (ESR), resonancia magnética nuclear (NMR), *Salix nigra*, *Salix alba*, *Salix matsudana*, *Populus nigra*, sauce, semillas ortodoxas, semillas recalcitrantes, tilacoides, transición vítrea

Abreviaturas

GN: germinación normal

GT: germinación total

EDX: energía dispersiva de rayos X

ESEM: microscopía electrónica de barrido (modo ambiental)

MET: microscopía electrónica de transmisión

RL: radicales libres

ROS: especies reactivas de oxígeno

TMG: tiempo medio de germinación

ABSTRACT

Willow seeds tolerate dehydration at water contents (WC) equivalent to those of orthodox seeds, but they lose viability in few weeks at room temperature. Similarly unusual is the fact that the chloroplasts of embryonic tissues in mature seeds conserve their endomembrane system (thylakoids) apparently intact, in addition to retaining chlorophyll. During the investigations carried out in the course of this study, there emerged results, in addition to those aforementioned that reveal the mechanisms possibly involved in the deterioration process and its reparation:

1. Light produces, by means of chlorophyll, intense photooxidative damage, as mediated by free radicals (FR), which was evaluated for damage to fatty acids, proteins and pigments, and largely produced the destruction to the thylakoid membranes.

2. The photooxidative attack is believed to originate in those membranes containing chlorophyll, proteins and pigments, to later spread to other structures. This hypothesis was proven by the evaluation of alterations in plasma membrane permeability.

3. While important, the photooxidative attack is mainly confined to the superficial tissues of the seed, without sensibly affecting the shoot apical meristem.

4. The damage to superficial tissues is evident in germination tests, causing the percentage of abnormal seedlings to be unusually high (decrease in normal germination (NG)), while the percentage of live seedlings (normal + abnormal = total germination –TG-) turns out to be only slightly less than that which occurs in the darkness.

5. The seeds that originate abnormal plants, as consequence of photooxidative attack exhibit significant recovery of NG and of the metabolic and structural damages aforementioned, when submitted to humidification.

6. Once the presence of chlorophyll is discarded as a significant cause of mortality, only two reactions remain as potential causes of the decay in dry seeds, that is, the Maillard and autooxidation reactions. As the former does not occur simultaneously with the decrease in TG, autooxidation, which does coincide, is presumed to be the cause of the rapid deterioration.

7. Item 6 leads to the consideration that the autooxidation that occurs in these seeds must be more active than in others that, like these, tolerate desiccation but live much longer.

8. This could be due to the fact that the state of the cellular content presents a greater molecular mobility and/or is more porous, which would facilitate the diffusion of oxygen, one of the reactants in autooxidation. The increased porosity which facilitates diffusion of oxygen and the greater lipid surface attackable by that agent due to the incomplete dedifferentiation of the membranes, are proposed as the initial causes of rapid deterioration in these seeds.

Key words: chlorophyll, chloroplast, free radicals (FR), electronic spin resonance (ESR), embryo membrane integrity, glass transition, endomembranes, lipid peroxidation, molecular mobility, N_2 sorption isotherms, NMR, photooxidation, *Salix nigra*, *Salix alba*, *Salix matsudana*, *Populus nigra*, orthodox seed, porosity, priming, reactive oxygen species (ROS), recalcitrant seeds, thylakoids, willow

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El *germoplasma* vegetal se conserva fundamentalmente como semilla. Las semillas constituyen sistemas deshidratados y por esta razón muchas herramientas para su estudio han sido las mismas con las que se encararon los estudios relativos a la estabilidad de los alimentos y otros biomateriales. Temas tales como: propiedades de sorción de agua, estado vítreo, pardeamiento no enzimático, reacciones de Maillard, reacciones de auto-oxidación se han abordado para caracterizar y predecir la estabilidad de alimentos y son también relevantes en la conservación de semillas. En el caso de los alimentos, el objetivo es conservar su valor nutritivo y sus características organolépticas. En el caso de las semillas, su conservación tiene como objetivo principal el mantenimiento de la viabilidad, es decir, que el sistema deshidratado conserve la capacidad de sustentar vida. Si bien esto implica una exigencia extra con respecto a la conservación de alimentos, como compensación conlleva la posibilidad de revertir cierto grado de envejecimiento y así aumentar la calidad de la semilla que fuera mantenida en almacenamiento, por procedimientos *ad hoc*.

Hasta hace poco tiempo la información sobre longevidad de las semillas o de la capacidad de almacenamiento era escasa y difícilmente cotejable por dos motivos: **a**. Surgía de trabajos en que las condiciones de almacenamiento diferían (lo cual aún ocurre con frecuencia) y rara vez se habían mantenido constantes y **b**. Se conocían semillas tolerantes y otras susceptibles a la desecación. Roberts en 1973 introdujo los términos ortodoxo y recalcitrante para definir esta dicotomía, y en una primera clasificación las separó en dos categorías: tolerantes a la deshidratación (u *ortodoxas)* y no tolerantes a la deshidratación (o *recalcitrantes)*. Las semillas ***ortodoxas*** son las que naturalmente se deshidratan hasta alcanzar un contenido de agua en equilibrio con la humedad ambiente (10-12% de contenido de agua) y pueden tolerar un posterior secado artificial hasta aproximadamente 5% sin perder la viabilidad. Existen marcadas diferencias entre las semillas ortodoxas de distintas especies en cuanto al lapso durante el cual se mantienen viables, el que varía desde algunos años hasta, en algunos casos, centurias. La longevidad resulta mayor cuanto menor son tanto

el contenido de agua como la temperatura en la que se encuentran. Ellis y Roberts (1980 a y b; 1981) han establecido una relación que permite predecir la viabilidad al cabo de determinado período de almacenamiento, siempre que durante el mismo tanto la temperatura como el contenido de agua se mantengan constantes (ecuación de predicción de viabilidad). En los bancos de germoplasma se recomienda almacenar las semillas con un contenido de agua de 5% y a una temperatura de –20 º C dado que esta se puede mantener con equipo de refrigeración relativamente poco costosos, accesibles a los bancos de germoplasma a nivel mundial. (Cuadro 1).

Las semillas ***recalcitrantes*** en cambio, pierden la viabilidad antes de que su contenido de agua se equilibre con la humedad del ambiente. El contenido de agua por debajo del cual pierden la viabilidad se alcanza relativamente en poco tiempo, de ahí que sean muy poco longevas. Se las puede mantener viables por lapsos relativamente cortos a altas humedades, a temperaturas ligeramente superiores a 0º C, y tratadas con biocidas. La crioconservación (Cuadro 1) es la solución al problema de una conservación prolongada.

A medida que mayor número de especies se fueron incorporando a estos estudios, se detectaron casos en los que el comportamiento se apartaba de aquellas dos categorías iniciales, por lo que, más recientemente se incluyó una tercera categoría llamada *intermedia*. Esta categoría abarca aquellas semillas que, si bien toleran la deshidratación natural, resultan afectadas en diferente grado por una posterior deshidratación artificial y/o muestran alguna susceptibilidad al frío en estado deshidratado. También incluye a semillas que pierden la viabilidad con contenidos de agua relativamente bajos aunque no tanto como el que alcanzarían deshidratándose naturalmente.

La etapa de deshidratación de las semillas ortodoxas, última fase del desarrollo programado de la semilla, se inicia con la acumulación de reservas en los tejidos del embrión y del endosperma (este es el tejido de las semillas cuya finalidad es la acumulación de reservas) y continúa con la des-diferenciación general de la compleja estructura de las células de esos mismos tejidos. La desdiferenciación implica la desorganización del citoesqueleto y la reducción general de membranas que acompañan la progresiva deshidratación y conducen a una drástica reducción del metabolismo. En el nivel subcelular, la

desdiferenciación de cloroplastos y mitocondrias se visualiza por la reducción de las membranas internas. La desdiferenciación de los cloroplastos y la consecuente degradación de la clorofila hacen que las semillas pierdan el color verde (*degreening*). Las restantes organelas citoplásmicas también se desdiferencian. Se considera que la desdiferenciación de las estructuras o componentes celulares constituye un requisito para que se toleren bajos niveles de contenido de agua sin pérdida de la viabilidad. En contraposición, en las semillas *recalcitrantes* las organelas no desdiferencian y el metabolismo no cambia.

La familia de las Salicáceas comprende aproximadamente 350 especies que se agrupan en dos géneros *Populus* (los álamos) y *Salix* (los sauces). En la práctica forestal, las especies de sauce y álamo se propagan por estacas dado la facilidad de éstas para enraizar, y no por semillas. Obviamente, la propagación por estacas acorta sensiblemente el tiempo requerido para que la planta alcance el tamaño que se desea. Por otra parte, la semilla presenta el inconveniente de la rápida pérdida de viabilidad. Sin embargo, las semillas resultan imprescindibles en los trabajos sobre mejoramiento genético dirigidos a mejorar la aptitud papelera y maderera de las Salicáceas, y así diversificar su uso, el que se encontraba restringido hasta no hace tanto tiempo a la fabricación de cajones como combustible. Estas actividades cobran relevancia debido a que el país cuenta con una de las zonas ecológicas más aptas para el cultivo de estas especies, como es el Delta del Paraná. Es probable que, al quedar el uso de las semillas limitado al mejoramiento, ésta haya sido la causa por la que fueran poco estudiadas, existiendo muy escasa información sobre las mismas en el nivel de sus propiedades físicas, químicas y su estructura y fisiología, como tampoco la que concierne a su rápida pérdida de viabilidad.

La corta longevidad de estas semillas determinó que en un principio se las clasificara como presuntamente *recalcitrantes* (King y Roberts, 1979). Esta categorización se mantuvo hasta hace relativamente poco tiempo (Pence 1995). Posteriormente se consideró que correspondían a la categoría de semillas de comportamiento ortodoxo porque toleran la deshidratación (Hong et al.,1996; Maroder et al. 1996) aunque quedaba sin explicar la causa por la cual esa tolerancia no estaba asociada a una longevidad de por lo menos algunos años, como ocurre con las ortodoxas típicas. En estas últimas se considera que el lento

envejecimiento está producido principalmente por reacciones de autooxidación y de Maillard que por ocurrir en estado deshidratado, donde la movilidad molecular es baja, son precisamente lentas. Dado que estas semillas también toleran la deshidratación, el proceso de envejecimiento debería ser similar. Cabe preguntarse, entonces, porqué, si estas semillas toleran la deshidratación, decaen en tan breve tiempo. Para contestar esta pregunta se encararon estudios sobre los aspectos señalados anteriormente con el fin de explicar ese comportamiento atípico y también conocer su comportamiento germinativo.

Todo lo que antecede, presenta a las semillas de sauce como un modelo de biomaterial que se caracteriza por constituir un sistema deshidratado de rápido deterioro no determinado por la pérdida de agua, lo que convierte en un modelo de interés en el área de la Conservación de Biomateriales. Resultan sistemas adecuados para analizar la relación entre reacciones de deterioro y las características físicas del medio en las que las mismas ocurren.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Una característica de estas semillas que diferencia estas semillas de las otras que también toleran la desecación pero son longevas, es que contienen clorofila. Por ese motivo, se postula que la activación de ese pigmento por la luz tendría un papel importante en la rápida pérdida de la viabilidad y en el comportamiento germinativo.

Cuadro 1.1.- Estudios en Salicáceas

Los estudios en semillas de sauce y álamo (Familia Salicáceas) son relevantes porque

(a) como semillas, la información que se genere abre la posibilidad de ensayar nuevos procedimientos de conservación, cuestión importante para los trabajos de Mejoramiento e Ingeniería Genética, en particular considerando que hoy las especies de Salicáceas tienen gran importancia en algunas economías regionales. El Delta del Paraná es la zona ecológica más apta, a escala mundial, para el cultivo de estas especies y constituye el mayor núcleo poblacional de Salicáceas en Argentina.

(b) Como biomaterial, estas semillas resultan interesantes porque combinan las características de ser tolerantes a la deshidratación y tener corta longevidad. Desde este punto de vista, constituyen un modelo novedoso en el área de Conservación de Alimentos y Biomateriales .

En el INTA-Delta se desarrolla un programa de mejoramiento de Salicáceas que busca la obtención de clones con un alto índice de crecimiento por unidad de tiempo, de buena sanidad, y con adaptación a la industria celulósica, papelera y aserradero. El objetivo del programa es revitalizar desde el punto de vista socio-económico esa región actualmente postergada

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Las semillas de *Salix alba* L., *S. matsudana* Koidz y *Salix nigra* L. fueron obtenidas de árboles crecidos en INTA-Delta, que es una estación experimental del INTA-Delta. Las semillas fueron coleccionadas entre los años 1997 y 2007 en el período del año que va desde mediados de octubre a principio de diciembre. La colección se realizó según el siguiente protocolo: las ramas cargadas de amentos (espigas péndulas) se cortaron de los árboles en el tiempo en que las cápsulas (frutos) se tornaban amarillentas y las semillas comenzaban a liberarse del fruto. Ya en el laboratorio, a temperatura ambiente, los amentos se separaron de las ramas y se distribuyeron sobre rejillas metálicas. Periódicamente, cada 4 horas (aproximadamente) se recolectaron las semillas liberadas por explosión de la cápsula y se separaron de la matriz algodonosa que las contiene, usando aire comprimido y se almacenaron a -70º C hasta ser usadas en los diferentes experimentos. El contenido de humedad de las semillas, que es aproximadamente 40% (base húmeda) en el momento de su liberación del fruto, después de aproximadamente 3 h a temperatura ambiente se reduce a 11±12%. Todas las operaciones señaladas se realizaron en condiciones de iluminación de baja intensidad.

MÉTODOS

(1) Determinación del contenido de agua.

El contenido de agua de las muestras se determinó gravimétricamente y se calculó en base a la masa antes y después del secado en estufa (1 h a 130º C ± 2 C), expresándose sobre base seca o húmeda, según los experimentos (ISTA, 1999).

(2) Pruebas de germinación

En todos los casos las pruebas de germinación se hicieron de acuerdo con el siguiente protocolo: se colocaron las semillas sobre papel humedecido (3 hojas) con 3.5 cm^3 de agua destilada-desionizada en cajas de Petri de 6-cm de diámetro a 25 ± 1º C y 16 h bajo luz fluorescente /8 h de oscuridad por 6 d. La germinación se considera normal si la plántula desarrolla los cotiledones, el hipocótilo y la raíz y está erecta; las plántulas que no reúnen estos criterios son clasificadas como anormales. La germinación normal (GN) fue evaluada usando cuatro réplicas de 25 semillas para cada tratamiento. En algunos experimentos también se estimaron la germinación anormal y la germinación total (semillas con germinación normal más semillas no-germinadas). Aunque las semillas frescas germinan dentro del período de 12 a 24 h (hasta 72 h para semillas con vigor bajo), el recuento definitivo se llevó a cabo el sexto día desde el momento de la siembra, de modo de poder reconocer sin dudas las plántulas anormales. En algunos experimentos se determinó además el tiempo medio de germinación (TMG), que fue calculado según la fórmula: $\Sigma (n_i t_i) / \Sigma n_i$, en la que n_i es el número de semillas germinadas en el tiempo t_i desde el comienzo de la imbibición.

La germinación a 24 h desde el momento de la siembra es considerada como un indicador del vigor; en este caso el criterio de germinación fue la protrusión del hipocótilo, teniendo en cuenta que (a diferencia de otras semillas) el primer signo visible de la germinación de las semillas de sauce es la extensión del hipocótilo (Pólya, 1961).

(3) Deshidratación de las semillas y tratamiento con nitrógeno líquido

Los lotes de semillas de *Salix alba* con 100 y 75% de germinación y 12% de humedad fueron deshidratadas a diferentes contenidos de agua. Las semillas fueron mantenidas a 5º C durante 24 h en atmósferas equilibradas con soluciones saturadas de K_2CO_3 (aproximadamente 43% de humedad relativa, HR) y LiCl (aproximadamente 15% HR) o con H_2SO_4 concentrado (aproximadamente 1% HR). Los contenidos de agua después de la deshidratación fueron 9% (K_2CO_3), 6.7% (LiCl) y 4.3% (H_2SO_4). Las semillas fueron luego puestas en crio-viales e inmersas en nitrógeno líquido (NL) durante 1 h; una muestra

con 100% de germinación y 12% de contenido de humedad fue mantenida en nitrógeno líquido durante 11 meses. Inmediatamente después del tratamiento con nitrógeno líquido los crioviales con semillas fueron transferidos a un baño de agua a 36 º C durante 1 min. El efecto de los tratamientos sobre la germinación fue evaluado. Un procedimiento similar fue seguido con un lote de semillas de *S. matsudana* que tenía 100% germinación y 11% de contenido de humedad. La deshidratación fue llevada a cabo solamente en soluciones saturadas de LiCl y H_2SO_4 concentrado. Los contenidos de agua después de la deshidratación fueron 6.5% (LiCl) y 4.4% (H_2SO_4).

(4) Almacenamiento a diferentes temperaturas

Un lote de semillas de *Salix alba* con 75% germinación y 9% de contenido de agua fue mantenido a –20º, 5º y 25º C. En otro experimento un lote de semillas de *S. matsudana* con100% de germinación y 10.5% de contenido de humedad fue puesto a –70º C. Las semillas se colocaron en contenedores sellados y, muestras de las mismas fueron periódicamente tomadas para evaluar su germinación. Para el lote almacenado a –70º C, la germinación a 24 h desde el momento de la siembra fue incluida como un indicador del vigor.

(5) Tratamiento de humidificación

Se evaluó el efecto de la humidificación sobre la germinación de las semillas de *S. alba* y y *S. matsudana*. Para ello se usaron tres lotes de semillas de *S. alba* (9% contenido de humedad), dos con aproximadamente 43% y uno con aproximadamente 16% de germinación y dos lotes de semillas de *S. matsudana* (10.5% contenido de agua) con 90 y 46% de germinación. Las semillas se mantuvieron en 100% HR: *S. alba* a 25º C y *S. matsudana* a 17º C. Las muestras fueron removidas en intervalos de 3 h y su germinación, evaluada. En las muestras de semillas de *S. matsudana*, el contenido de agua y el porcentaje de germinación fueron también determinados cada hora durante las primeras 3 h de humidificación.

(6) Microscopía de campo claro, de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión

Semillas enteras (diámetro 10 x 0.5 x 0.3 mm) fueron fijadas en glutaraldehído 2.5% en *buffer* fosfato 0.1M, pH 7,5 a 4° C, durante 2 h. Para los estudios de microscopía de campo claro los tejidos fijados fueron deshidratados mediante una serie de etanol hasta llevarlos a acetona, luego tratados en una serie creciente de acetona-resina y finalmente embebidos en esta última (resina JB4 (2-butoxiethanolmethacrylate-Polyscience, Warrington, Pa). Para realizar los estudios subcelulares, las semillas fijadas en glutaraldehído fueron post-fijadas en OsO_4 1% en el mismo buffer durante 1 h, deshidratadas en una serie etanol-acetona y embebidas en resina Spurr (Sigma – Aldrich, USA) según el protocolo descrito en Maldonado y Lott (1991). Los tejidos frescos, los tejidos embebidos en JB4 y en resina Spurr. fueron usados para los análisis histoquímicos. Las secciones semi-finas se tiñeron con ácido fucsínico y toluidina blue O (Feder y O´Brien 1968), floroglucinol y azul brillante coomassie (Pearse 1985), fase green FCF (Fulcher et al. 1972), iodo-ioduro de potasio y ácido periódico-Schiff (O´Brien y McCully 1981), sudan black B (Bronner 1975) y sulfato férrico (Leigh y Sanders 1997). Las secciones se montaron sobre grillas cubiertas con Formvar y luego carbón, teñidas en acetato de uranilo seguido por citrato de Cu y analizadas con microscopía electrónica de transmisión (Zeiss M109).

(7) Determinación de proteínas

La técnica de cuantificación de nitrógeno total ó micro-Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) fue realizada con un analizador Kjeltec Auto 1030. (Tecator, Höganäs, Sweden) en semillas enteras (proteínas totales), la fracción de extractos solubles (proteínas solubles) y la fracción insoluble (proteínas insolubles). La fracción de extractos solubles fueron obtenidas como se describió anteriormente, excepto por el agregado del combinado inhibidor de proteasas (ya que agregaría nitrógeno no proveniente de las semillas) y combinando los cinco extractos por cuadruplicado (LS, HS, E, H), con el objetivo de obtener el total de proteína soluble. La fracción insoluble fue obtenida a partir de los correspondientes precipitados obtenidos luego de la extracción de solubles, por cuadruplicado.

El contenido de proteínas fue estimado por la ecuación (2.5):

$$P = \frac{(V_{HCl} - V_{HCl-blank}) \times f \times N_{HCl} \times 10^{-3} \frac{l}{ml} \times 14g \times 6{,}25}{m} \times 100$$

donde P es el contenido de proteínas (g/ 100 g semillas); m es la masa de muestra de semilla (g); V_{HCl}, es el volumen del ácido estándar (mL) (ácido clorhídrico), $V_{HCl\text{-}blank}$, es el volumen del ácido estándar necesario para la titulación del reactivo blanco (mL); N_{HCl}, es la normalidad del ácido estándar; y f, factor de normalidad del ácido estándar; 6,25 es el factor utilizado para transformar los valores de nitrógeno orgánico total en valores de proteínas y 14 g es la masa molar del nitrógeno.

(8). Determinación del contenido de lípidos por RMN

La determinación del contenido de lípidos se realizó por medio de resonancia magnética nuclear mediante una técnica estandarizada que emplea ecos de espín mediante la aplicación absoluta correspondiente, provista por el software (absolute\seoi). Para la realización de la curva de calibración se empleó el material lipídico de semillas de sauce extraído con hexano en un extractor soxhlet durante 6h. Se pesaron en una balanza analítica (±0.00001g) entre 0.01g y 0.1g de dicho material dentro de capilares que a su vez se introdujeron en tubos de RMN de vidrio de 10 mm de diámetro de manera de no superar los 2.5 cm de altura. Se empleó un espectrómetro Bruker NMS 120 (20 MHz). La técnica se basa en la cuantificación de la señal de relajación de los núcleos de hidrógeno presentes en aceite a los 7 ms debida a la aplicación de pulsos cortos de radiofrecuencia.

Luego se colocaron semillas de sauce en los tubos de vidrio (también cuidando de no superar los 2.5 cm de altura) y se realizó la lectura correspondiente, que arrojó una cantidad de lípidos del 20% sobre base seca.

La Figura 2.1 muestra la curva de calibración y el punto correspondiente a la muestra de semillas de sauce. Como la muestra representada corresponde a 0,3g de semillas secas, el contenido de lípidos en las mismas se estimó en 20,6%, a partir de la curva de calibración descripta. Los resultados gravimétricamente obtenidos, luego de la extracción por soxhlet dieron resultados menores (15%), lo que revelaría la extracción incompleta de los lípidos. La obtención de curvas de fusión muy marcadas en los termogramas obtenidos por DSC, también indican un alto contenido lipídico.

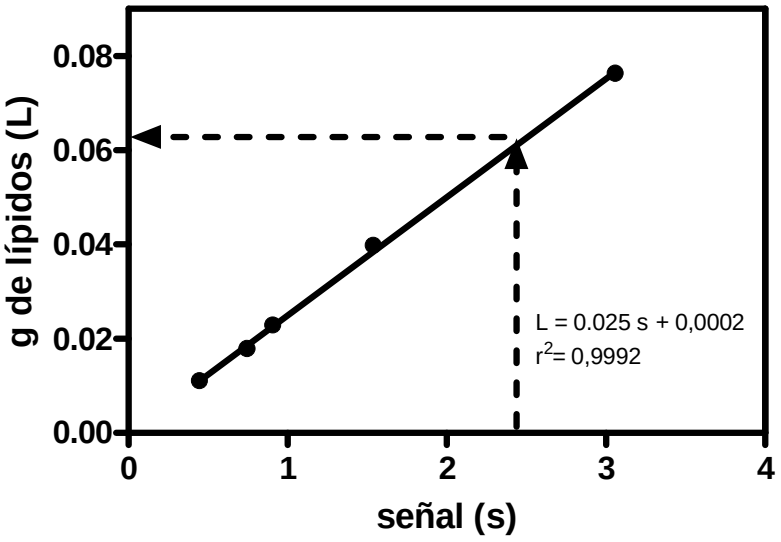


Fig. 2.1.- Curva de calibración y punto correspondiente a la muestra de semillas de sauce

(9) Análisis EDX

El estudio de la composición elemental de los cristales globoides se hizo utilizando secciones gruesas (1 mm) de tejido fresco. El material fue examinado en el modo ambiental de un microscopio electrónico Philips XL 30 ESEM. El análisis EDX fue realizado rutinariamente con un voltaje de aceleración de 20 kV, en un tiempo de análisis de 60 s, y un rango de conteo entre 1500 y 2000.

(10). Tratamiento con luz

Las semillas fueron expuestas a diferentes condiciones diferentes de iluminación: oscuridad, 140lux, y 1300 lux, durante 3 días a 25ºC. En todos los casos las semillas fueron mantenidas a 45% HR, en atmósfera en equilibrio con solución saturada de K_2CO_3, estabilizando el contenido de agua a 9%.

Los tratamientos se realizaron en un incubador (Cooled Incubator MIR-153 SANYO), en atmósfera de aire o nitrógeno.

(11) Análisis de resonancia de espín electrónico (Electron Spin Resonance -ESR)

Se realizaron cuatro réplicas de 150 mg de semillas para cada tratamiento. Las semillas fueron transferidas a un tubo de cuarzo ESR. Los espectros de ESR fueron realizados a 20º C en un espectrómetro ESR (X-band ESR Spectrometer Bruker ECS 106-Brucker Instruments, Inc., Berlin, Germany). Las condiciones del espectrómetro fueron: poder de microonda 1 mW, campo central 3445, amplitud de barrido de 1000 G, tiempo de conversión 5.12 min, constante de tiempo 5.12 m, frecuencia de modulación 50 KHz, amplitud de modulación 0.1 G, ganancia 2.104, y resolución 1024 puntos. El número de registros varió entre 100 a 400 dependiendo de la intensidad de la señal. La intensidad de la señal radical fue medida como la altura total del pico de radical libre en la intensidad de la señal del primer espectro derivativo. Todos los espectros ESR tuvieron formas lineales y amplitud de línea equivalentes, con la intensidad de la señal ESR fueron considerados proporcionales a las concentraciones radicales. Por lo tanto, las concentraciones radicales fueron estimadas a partir de las alturas totales de los picos respectivos y expresadas como medidas relativas, relacionando dentro de cada espectro la interrelación entre la altura del pico de radical libre y la altura del pico de campo bajo de manganeso.

(12). Extracción de lípidos y análisis de ácidos grasos analizados por GLC

El análisis de los ácidos grasos se llevó a cabo usando semillas liofilizadas. El material fue transferido a tubos *eppendorf* de 1,5 ml y los lípidos totales fueron extraídos usando la mezcla cloroformo–metanol usando el procedimiento descrito por Folch *et al.* (1957). Los extractos de lípidos totales fueron secados y pesados,

suspendidos en 2 ml de una solución fresca de 10% KOH en etanol y saponificados durante 60 min a 80º C usando tubos de vidrio con tapa esmerilada. Se agregaron 2 ml de hexano y los ácidos grasos se extrajeron por agitación. La fase superior orgánica (no-saponificable) fue descartada. La capa acuosa fue acidificada +con 1.5 ml de HCl concentrado y los ácidos grasos se extrajeron dos veces con 1.5 ml hexano. Los extractos conteniendo los ácidos grasos libres fueron secados bajo una corriente de nitrógeno, disueltos en 1.5 ml BF_3 (10% en metanol) y 1.5 ml de benceno y esterificados por calentamiento y agitación a 100º C durante 1 h. Los ésteres de ácidos grasos (Fatty Acid Methyl Esters -FAME) se extrajeron dos veces con hexano y lavados con agua destilada. Después de un lavado, la fase orgánica fue evaporada bajo una corriente de nitrógeno, re-disuelta en hexano, y analizada por Gas-Líquido Cromatografía (GLC). Luego, 1 µl de la solución FAME fue inyectada en una columna capilar (30m x 0.25mm, 0.25 µm film) (Omegawax X250 -Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania) en un cromatógrafo Hewlett Packard HP-6890 equipado con un detector flame ionization. La temperatura de la columna fue programada para un incremento linear de 3º C/min desde 175 a 230º C. Los picos cromatográficos de FAME fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con estándares bajo las mismas condiciones.

(13). Determinación de clorofilas y carotenos

El análisis de clorofilas y carotenos se hizo según los siguientes protocolos: las semillas pulverizadas fueron embebidas en cloroformo:metanol (2:1 en volumen) (Arnon 1949) y Lichtenthaler (1987). La mezcla fue sonicada durante 10 min y luego centrifugada a 8000 x g. La extracción se repitió tres veces y el extracto fue secado en corriente de nitrógeno, re-disuelto en N,N-dimetilformamida y centrifugado durante 10 min a 8000 x g. La absorbancia fue leída con un espectrofotómetro. Para la conversión de las lecturas a contenidos de clorofila y carotenos, se utilizaron las ecuaciones (2.3) del estudio de Inskeep y Bloom (1985) y Lichtenthaler (1987), que son las siguientes:

Chl *a* (µg/mg de peso seco) = 12.70 $A_{664.5}$ – 2.79 A_{647}

Chl *b* (µg/mg de peso seco) = 20.70 A_{647} – 4.62 $A_{664.5}$

Total Chl (µg/mg de peso seco) = 17.90 A_{647} – 8.08 $A_{664.5}$

Carotenos tot (µg/mg de peso seco) = (1000. A_{470} – 1,82 . Chl *a* – 85,02 . Chl *b*) / 198

A = Absorbância

(14). Determinación de proteínas oxidadas

La medición de las proteínas oxidadas se realizó de acuerdo a la técnica descrita en Reznick y Packer (1994). Esta técnica cuantifica espectrofotometricamente la formación de dinitrofenilhidrazona unida a proteínas a través de la reacción del la 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPh) y los carbonilos de las proteínas oxidadas. Este compuesto tiene un pico de absorción entre 355 y 390 nm y su coeficiente de extinción es 22.000 M^{-1} x cm^{-1}.

Las semillas se homogenizaron en una solución de buffer de fosfato de potasio 50 mM ph 7,6 EDTA disódico 1mM. El homogenato se centrifugó 15.000 x g durante 20 minutos. Se extrajo el sobrenadante el cual se incubó 15 minutos con 10% de sulfato de estreptomicina a temperatura ambiente para eliminar restos de DNA los cuales interfieren en el reacción. Nuevamente las muestras fueron centrifugadas 15.000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante fue incubado 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad con 2,4-DNPh 10 mM + HCl 2,5 N. Al cabo de ese tiempo se agregó TCA 20% y se dejó 10 minutos en hielo permitiendo así la precipitación de las proteínas. Se centrifugó la muestra (15.000 x g durante 10 minutos) conservándose esta vez el pellet que es donde se encuentran las proteínas. El pellet se lavó con Etanol:Acetato de Etilo (1:1) hasta que el sobrenadante perdió el color. Por último se disolvió el pellet en clohidrato de guanidina 6 M. La absorbancia se leyó con un espectrofotómetro a 370nm.

(15). Determinación de productos de Maillard

Previo a la determinación de los pigmentos pardos, se procedió a la eliminación de clorofila, según la metodología de Arnon (1949) ya que la presencia de la misma enmascara la determinación de color. Se analizó la fluorescencia de las fracciones solubles proteicas obtenidas a partir de semillas de sauce. Las proteínas fueron fraccionadas utilizando una modificación del procedimiento tradicional de extracción secuencial de proteínas de Osborne (Osborne, 1924).

Aproximadamente 30 mg de semillas molidas fueron incubadas con 1,5 mL de una serie secuencial de soluciones de extracción: 50 mM Tris-HCl (Sigma), 200 mM NaCl (Merck) *buffer* (pH 8.3) (Low Salt, LS) por 20 minutos en hielo (dos veces). Los sobrenadantes obtenidos luego de 10 minutos de centrifugación a 15000g (Eppendorf 5424, Hamburg, Alemania) fueron guardados en freezer (-18ºC) hasta su posterior análisis.Las proteínas que se extraen son albúminas (Aluko, 2004).

Las fracciones solubles fueron diluidas de manera tal de obtener una absorbancia a 380nm menor que 0,1 (Skoog y col., 2001). Esto es para evitar el efecto de filtro interno, ya que los pigmentos absorben a la λ de excitación de los compuestos fluorescentes.

La intensidad máxima obtenida del espectro de emisión (excitación a 380 nm) fue calculada siguiendo la siguiente ecuación (2.4) (Matiacevich y Buera, 2006):

$$UF = \frac{UF_x \cdot f \cdot d - b}{m \cdot g}$$

Donde UFx fue la medida de intensidad de fluorescencia obtenido para cada fracción soluble; f, el factor de sensibilidad del instrumento; d, el factor de dilución; b, ordenada al origen de la curva de calibración realizada de sulfato de quinina en 0,1 N H_2SO_4 (BDH); m, la pendiente de la curva de calibración; y g, el peso de las semillas (g) utilizadas para la extracción de las proteínas. Todos los reactivos fueron de grado analítico.

Los espectros informados corresponden al barrido realizado por el equipo a partir de dos mediciones por muestra, y habiendo realizado automáticamente la corrección matemática por la potencia de la lámpara en cada longitud de onda.

Las mediciones de emisión de fluorescencia, se realizaron en un espectrofluorímetro Ocean Optics USB 2000, Ocean Optics Co., U.S.A., con tiempo de integración de 30 mseg, promedio de 50. Programa OOibase 32.

(16). Determinación de malondiadehido (MDA)

Este compuesto se evalúa por medio de una técnica colorimétrica donde el ácido tiobarbitúrico (TBA) se une al MDA formando una base de Schiff que absorbe a 532 nm (Yagi 1976).

Con un mortero se homogenizaron las semillas en un buffer fosfato 30 mM ph 7,4 KCl 120 mM y PVP. El homogenizado se centrifugó a 3000 x g 10 minutos y se descartó el pellet. Paralelamente se prepara un blanco el cual contiene buffer en vez de muestra. Se tomó una alícuota del sobrenadante a la cual se le agregó BHT 100 mM y TCA al 20 % p/v lo que luego de una incubación de 20 minutos y una centrifugación produjo la precipitación de las proteínas. El sobrenadante se colocó en tubos hermético y se adicionó TBA 0.7 % . Los tubos tapados se pusieron a baño maría 100º C durante 1 hora, pasado ese tiempo, se enfriaron en hielo y se realizó la lectura espectrofotometrica.

(17). Prueba de conductividad eléctrica

La conductividad del filtrado se determinó según el siguiente protocolo: 300 mg de semillas se sumergieron en 8 ml de agua destilada, durante 3 h a 20° C. Se hicieron tres réplicas. La conductividad del medio acuoso se midió con un Conductivímetro Altronix Modelo CTX-II. Para la calibración del equipo se empleó una solución de KCl 3M. Los resultados se expresaron como $\mu S\ mg^{-1}$ de semillas secas. Los valores correspondieron a los valores promedio ± DS.

(18). Estudios de sonda de espín (Spin probe ESR)

La detección de los espectros de resonancia de ESR usando la técnica de Spin Probe y un agente amplificante, con el objeto de estudiar los cambios en las propiedades de barrera de las membranas, han sido descriptos en Golovina y Tikhonov (1994) y en Golovina et al. (1997).

Brevemente, las semillas fueron tratadas con una solución de TEMPONE (4-oxo-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidyneloxy)(Sigma). TEMPONE es un radical nitróxido anfifílico y estable que permeabiliza la membrana plasmática y separa las fases hidrofílica e hidrofóbica del citoplasma, dando a cada fase una señal ESR específica. El ferrocianuro es soluble en agua y no atraviesa la membrana plasmática excepto cuando las áreas dañadas están presentes decreciendo la amplitud de la señal (amplificante) correspondiendo a la fase hidrofílica, siendo el decrecimiento de la señal proporcional al daño de la membrana. La razón entre amplitud de ambas señales cuantifica el daño de la membrana. Ambas sustancias actúan como sondas paramagnéticas, permitiendo su detección por resonancia de espín electrónico.

Para cada tratamiento, tres réplicas de 150 mg de semillas cada una fueron embebidas durante 6 h a 4° C en 1 mL de agua. Después de eso, O,5 mL se extrajeron de agua y se agregó 2 mL de la solución TEMPONE, se mezcló y luego se agregaron 0,5 ml de ferrocianuro de potasio hasta una concentración final de 120 mM y las semillas incubadas durante 15 min. Después de esto, se extrajo el solvente y las semillas se secaron a 20° C durante 2 h a humedad relativa ambiente. Las semillas secas fueron selladas en un capilar de 2 mm de diámetro. Las mediciones de ESR fueron realizadas a temperatura ambiente con el espectrómetro X-band ESR arriba mencionado. Las condiciones estándar del espectrómetro para los radicales nitróxidos fueron: campo central 3483 Gauss; amplitud de barrido 80 Gauss; poder de microonda 6,35 $.10^{-1}$ mW; frecuencia de la micro-onda 9,62 GHz; el tiempo de conversión 2,56 min; constante de tiempo 2,56 min, frecuencia de modulación 50 KHz; amplitud de modulación 9,52 $.10^{-2}$ Gauss; y ganancia 1,12. 10^{4}. Se acumularon 20 espectros para mejorar la relación señal/ruido.

(19). Calorimetría diferencial de barrido (DSC)- Transiciones vítreas

La transición vítrea puede ser detectada y estudiada por distintos métodos. El método calorimetría de barrido diferencial (DSC) es el más utilizado, y es capaz de detectar la transición vítrea en base al cambio en el calor específico cuando el material pasa del estado sólido amorfo a líquido sobreenfriado. A continuación se muestra un termograma típico (obtenido por DSC) de un azúcar liofilizado que muestra sus transiciones de fase y cambios de estado (Adaptado de Roos, 1992). El calor específico es otra de las propiedades que cambian en las cercanías de la transición vítrea.

Se produce un cambio escalonado en el calor específico a medida que un sistema es calentado y atraviesa la transición vítrea.

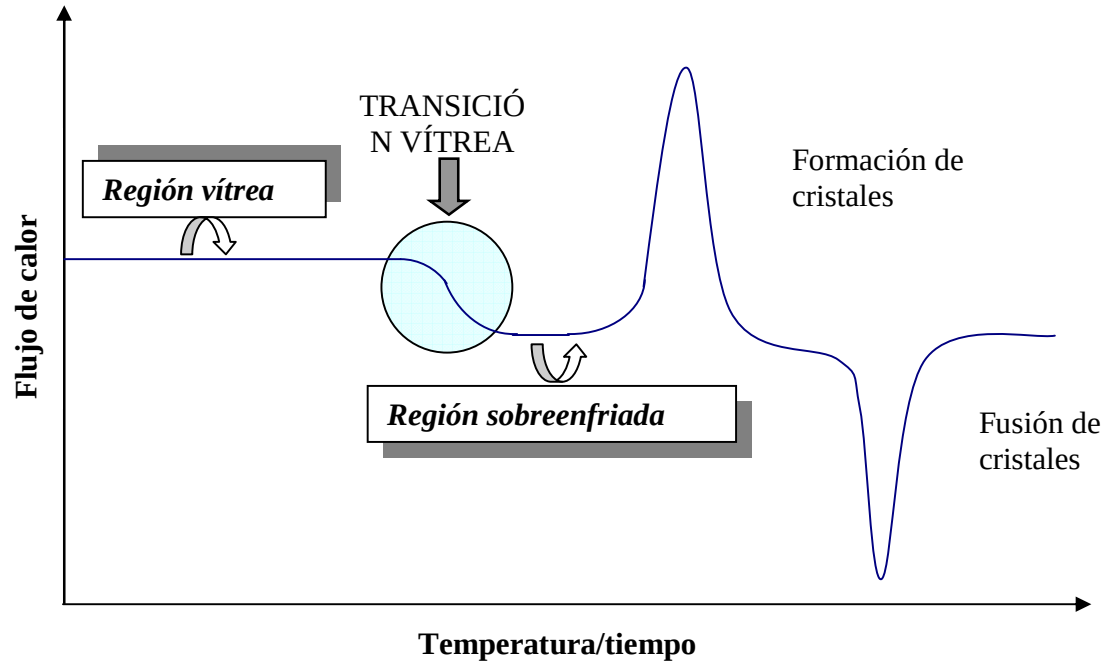


Fig. 2.2.- Termograma típico de un azúcar liofilizado (Adaptado de Roos, 1992).

En dicho termograma se representa el flujo calórico en función de la temperatura o bien del tiempo de calentamiento de la muestra. La muestra se calienta a una velocidad constante en una cápsula sellada, y en general se utiliza una cápsula vacía como referencia.

El flujo diferencial de calor se monitorea durante el calentamiento de la muestra y de la referencia. El cambio en el calor específico del sólido que ocurre a la temperatura de transición vítrea de la muestra, se evidencia como un cambio en la línea de base del termograma a medida que la muestra es calentada a una velocidad constante desde una temperatura inicial menor que T_g hasta temperaturas mayores. A temperaturas más altas que T_g, el azúcar se transforma en un líquido sobreenfriado. A medida que la temperatura y la movilidad aumentan, y la viscosidad disminuye, las moléculas de azúcar pueden reorientarse hasta alcanzar un estado termodinámicamente más estable como lo es la estructura cristalina. La cristalización se manifiesta como un pico exotérmico en el termograma. Al aumentar aun más la temperatura, el azúcar funde produciendo un pico endotérmico. Un termograma como el descrito, demuestra el efecto de la temperatura sobre el estado físico de un alimento liofilizado que contiene azúcares.

Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido (DSC) Mettler 822 con software para análisis térmico Stare v6.0. Una fotografía del equipamiento utilizado se muestra en la Figura 2.1. El barrido de calentamiento se realizó en el rango desde -140ºC a 120ºC. El enfriamiento del equipo se obtiene por utilización de nitrógeno líquido a una presión en el tanque de 150 kPa.

El equipo se calibró con indio (punto de fusión 156,6°C), plomo (punto de fusión 327,5°C) y zinc (punto de fusión 419,6°C). Las muestras se colocaron en cápsulas ó crisoles de aluminio (Mettler, 40 μl) herméticamente cerradas, se pesaron para determinar la masa (7-15 mg/cápsula según el tipo de material) y se midieron utilizando como referencia una cápsula de aluminio cerrada pinchada y vacía en todas las mediciones. Una corriente continua de nitrógeno gaseoso de 200 mL/min medido con un caudalímetro (Bruno Shillig, Argentina) fue utilizada para evitar condensación de agua sobre las cápsulas y sobre el sensor. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se informó el valor promedio.

Se determinaron las temperaturas de transición vítrea (T_g) y las transiciones entálpicas (cristalizaciones, fusiones, etc.) de los sistemas estudiados en forma dinámica durante el calentamiento, utilizando una velocidad de calentamiento de 10°C/min a partir de las discontinuidades detectadas en las curvas de flujo de calor versus temperatura. La T_g se consideró como la temperatura a la cual comienza el cambio en el calor

específico (valor “onset”) que se detecta en el termograma como un corrimiento endotérmico en la línea de base. Los valores de entalpía (ΔH) se obtuvieron calculando el área de la transición exotérmica o endotérmica, en relación a la masa de muestra (J/g).

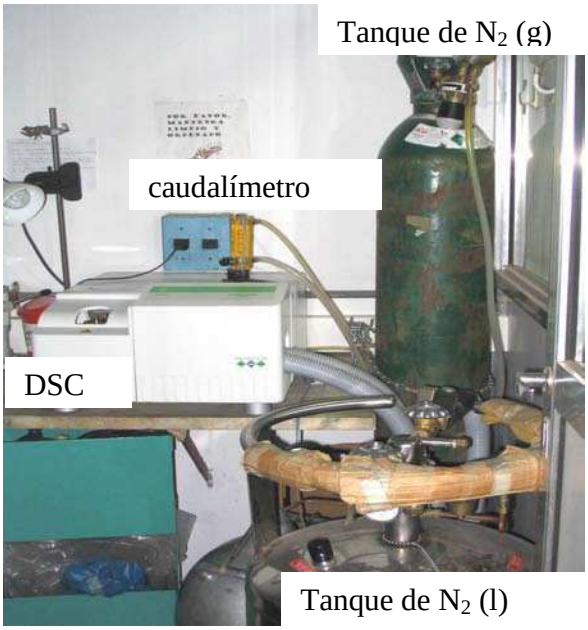


Fig. 2.2.- Fotografía del equipo de calorímetria diferencial de barrido (DSC).

(20). Resonancia nuclear magnética (RMN)

Para distinguir poblaciones de agua con distinta movilidad se empleó resonancia magnética nuclear resuelta en el tiempo (^{1}H-NMR). Se utilizó un equipo Bruker Minispec mq20 (20 MHz) (Figura 2.2).

Se analizaron muestras de 3 mL de cada sistema (glicina-glucosa, glicina-trehalosa ó glicina-sacarosa) en buffer fosfato pH 5, líquidas o liofilizadas equilibradas a distintas humedades (en el rango 11-97% HR), tratadas a distintos tiempos de almacenamiento a 70±1°C. Se midió el tiempo de relajación transversal espín-espín (T2) (Figura I.8) utilizando el método de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (Meiboom and Gill, 1958).

Previamente a las mediciones las muestras se equilibraron a 25ºC en un baño de agua termostático (Haake PhoenexII C35P, Alemania). Los datos obtenidos fueron de un promedio de cuatro adquisiciones de

256 puntos, con ciclado de fases, usando una ganancia de 68 y un tiempo de interpulso (τ) de 0,5. Se registraron suficientes ecos de manera que a línea de base fuera cero y que el T_2 fuera determinado por el envolvente del decaimiento del eco utilizando el programa exponencial provisto por el proveedor del equipo.

Fig. 2.3.- Equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Minispec 20 (Brucker) y PC (H.P).Resonancia nuclear magnética resuelta en el tiempo.

(21). Isoterma de adsorción

(a) De agua

Para la determinación de la isoterma de adsorción se utilizó el método gravimétrico con registro discontinuo de cambios de peso y el sistema estático, el que consistió en colocar el material en desecadores a vacío conteniendo sales saturadas, las cuales proporcionaron una cierta humedad relativa en el equilibrio. Las soluciones salinas saturadas de humedad relativa tabulada empleadas fueron: LiCl, KH_2COOH, $MgCl_2$, K_2CO_3, $Mg(NO_3)_2$, NaCl, KCl, KSO_2 para humedades relativas de 11, 22, 33, 43, 52, 75, 84 y 97% (Greenspan, 1977); y se mantuvieron durante durante 15 días a 20°C.

Para obtener la isoterma de adsorción y el valor de humedad residual correspondiente al valor de monocapa (m_o) se ajustaron los datos obtenidos de contenidos de humedad correspondientes a cada

actividad de agua, a la ecuación de G.A.B y a la de B.E.T. Las ecuaciones de G.A.B. y de B.E.T. utilizadas se presentan en las expresiones 2.1 y 2.2, respectivamente:

$$\frac{A_W}{m} = \alpha Aw^2 + \beta Aw + \varepsilon$$

Donde:

$$\alpha = \frac{Kb}{m_o}\left[\frac{1}{c} - 1\right] \qquad \beta = \frac{1}{m_o}\left[1 - \frac{2}{c}\right] \qquad \varepsilon = \frac{1}{m_o K_b c}$$

$\alpha, \beta, \varepsilon$: parámetros de ajuste

Aw : actividad de agua

K_b y *c* : constantes de la ecuación de GAB

m : humedad en base seca (g H_2O/ g semillas secas)

m_o : humedad de la monocapa (g H_2O/ g semillas secas)

$$\frac{Aw}{(1 - Aw)m} = \frac{1}{m_o c} + \left[\frac{c - 1}{m_o c}\right] Aw$$

Donde:

c : $e^{\frac{Q_s}{RT}}$: constante calórica superficial de BET

Q_s : calor de sorción de BET (cal/mol H_2O)

R y T : constante de gases y temperatura respectivamente.

Para la determinación de la isoterma y parámetros de la ecuación de GAB se utilizó una regresión no lineal de segundo orden, mientras que para los de la ecuación de BET , una regresión lineal.

Para el ajuste de datos se empleó un software de la biblioteca GraphPad Prism.

(b) De nitrógeno

Con el fin de evaluar la porosidad del contenido celular de las semillas de sauce en estado deshidratado, se determinó la capacidad de adsorción de nitrógeno de semillas secas. Se emplearon también semillas de trigo para comparar la porosidad de ambos tipos de semillas de muy distinta longevidad. Las muestras se congelaron bajo nitrógeno líquido (77k, -196º C). Las isotermas se determinaron a esta temperatura empleando un equipo automático de adsorción de gas (Sorptometer Gemini 2360 V2.00) luego de desgasificar las muestras a vacío, en el rango de P/P_o de 0.09 a 1 (multipunto). Se realizó también el cálculo de las áreas superficiales por punto único a $P/P_o = 0.03$. A partir de los resultados obtenidos se calculó el área específica de porción (SBET) por el método Brunauer-Emmett-Teller (BET) y el volumen total del poro (TPV) estimado a partir de la ecuación de Barret-Joyner-Halenda (BJH).

(22). Análisis estadístico

Todos los resultados los valores corresponden a la media ± el desvío estándar (DS). Las diferencias entre tratamientos se determinaron usando el test de Tukey con $\alpha \leq 0.05$.

CAPÍTULO 3.I

EL COMPORTAMIENTO DE LAS SEMILLAS DE SAUCE EN RELACIÓN AL SECADO, LA TEMPERATURA Y LA HUMIDIFICACIÓN

INTRODUCCIÓN

Las semillas de sauce (*Salix* sp.) tienen corta vida y a temperatura ambiente su viabilidad se pierde en pocas semanas (Teng y Yu, 1948; Arya y col., 1988); por ello, no es posible encontrarlas a la venta (Brinkman, 1974). Inicialmente se consideró que se trataba de semillas recalcitrantes (King y Roberts,1979; Pence, 1995). Más recientemente, Hong y col. (1996) clasifican las semillas de 28 especies de sauce encontrando que 27 correspondían a la categoría ortodoxas y la restante, *S. caprea,* a la de comportamiento intermedio. Estos últimos autores tienen en cuenta que las semillas de aquellas 28 especies se habían mantenido sin pérdida de la viabilidad por algunos años en condiciones de temperaturas bajo cero y bajo contenido de humedad (Crocker, 1938; Sato, 1955; Zasada y Densmore, 1977, 1980; Simak, 1982; Densmore y Zasada, 1983; Bol'shakow, 1988). *S. alba*, *S. matsudana* y *S. nigra* no se incluyen en esta re-clasificación. A medida que las semillas de un lote van envejeciendo, y antes de que pierdan la viabilidad, los daños a los componentes celulares asociados a ese proceso de envejecimiento se reflejan en una progresiva disminución de la calidad fisiológica que mostrarán las plántulas generadas de esas semillas. Así resultara afectadas características como altura, desarrollo de la raíz, longitud del hipocótilo, tamaño, color, como así mismo la velocidad de germinación. Estas características definen el vigor. Por lo tanto un lote de semillas que muestra germinación rápida, uniforme y un desarrollo normal de las plántulas, tienen alto vigor mientras que un lote que carece de esas características tiene bajo vigor. Cabe mencionar que esta es una definición de vigor de alcance restringido, o mejor dicho, adaptado al marco experimental de esta tesis, en la que evalúa el comportamiento germinativo en las clásicas pruebas de germinación sobre papel embebido en agua, lo que, por otra parte es lo que corresponde a este tipo de trabajo. Una definición mas amplia del concepto de vigor

incluye un ítem sumamente importante como es la velocidad de emergencia a campo que obviamente aquí no se considera.

Los parámetros germinativos que se consideran a lo largo de esta tesis son germinación normal (GN), germinación anormal (GA) y germinación total (GT) y tiempo medio de geminación (TMG) y, eventualmente otros parámetros cuando se hace referencia a la bibliografía.

En este capítulo se considera la cuestión de la tolerancia a la desecación y la longevidad a diferentes temperaturas a fin de precisar la información existente, sobre todo teniendo en cuenta que la categoría ortodoxa asignada a estas semillas no parecería corresponder, al menos estrictamente, con la longevidad que se espera de una semilla perteneciente a esa categoría.

También este capítulo trata sobre el efecto que tiene la humidificación, sobre todo porque entre los poquísimos trabajos fisiológicos dedicados a estas semillas se encuentra a Polya et al. (1961) quien detectó en semillas de álamo que ese proceso mejora el comportamiento germinativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semillas de *S. alba*, inmediatamente luego de ser expulsadas de la cápsula, exhibieron un contenido de de agua (ca) de 40% y un porcentaje de germinación de 100%. La inmersión de las semillas recientemente liberadas en nitrógeno líquido fue letal, ya que la germinabilidad fue nula. Después de tres horas de permanencia en condiciones ambientales, el contenido de agua descendió a 12% sin que se registrara reducción del porcentaje de germinación; las semillas deshidratadas de este modo no fueron afectadas por el tratamiento con nitrógeno líquido (Tabla 3.I.1). Resulta evidente, entonces, que 3 h de deshidratación natural fueron suficientes para reducir el contenido de agua (ca) por debajo de aquél que permite la formación de hielo, letal para los tejidos vivos (Stanwood, 1985). Este lote de semillas con 100% de germinación toleró una posterior deshidratación artificial a 9 y 6,7% de ca sin que se redujera significativamente la germinación inicial (Tabla 3.I.1). Esta se redujo a la cuarta parte cuando el ca bajó a 4.3%. El lote de semillas con 75% de germinación inicial fue más susceptible a la deshidratación ya que, a diferencia del lote con 100% de germinación inicial, cuando el ca se redujo a 6.7% hubo una disminución significativa a 55% de germinación, y una más acentuada deshidratación a 4.3% ca la redujo a 33% (Tabla 3.I.1). Se observo que en ambos lotes, la germinación de semillas con ca entre 12 y 4.3 no resultó afectada por el tratamiento con nitrógeno líquido.

Contenido de humedad (% base húmeda)	Germinación inicial normal			
	100%		75 %	
	- LN	+ LN	- LN	+ LN
12	100[a]	98[a]	75[a]	70[a]
9	94[a]	96[a]	68[a]	66[a]
6-7	89[a]	93[a]	55[b]	54[b]
4-3	23[b]	28[b]	33[c]	36[c]

Tabla 3.I.1.- Influencia del contenido de agua sobre la germinación (%) de dos lotes de semillas de Salix alba que difieren en la germinación inicial, expuestos a nitrógeno líquido (+LN) y no expuestos nitrógeno líquido (-LN). Los valores seguidos con la mismo letra (superíndice) dentro de la columna son no significativamente diferentes en *P* = 0.05 por el test de Tukey

Similares resultados con respecto a la deshidratación y a la tolerancia al nitrógeno líquido se obtuvieron con semillas de *S. matsudana* (Fig. 3.I.1). Semillas recién expulsadas presentaron 41% de ca y entre 98 y 100% de germinación inicial; deshidratadas por 3 h en condiciones ambientales redujeron a 11% el ca sin afectar la germinación. Una mayor reducción del ca a 6,5%, llevó la germinación al 86 %, mientras que una reducción aún mayor a 4.4% ca la bajó a 16.5%. Como en el caso de *S. alba*, el nitrógeno líquido resultó letal para las semillas recién expulsadas, pero no afectó la germinación de las semillas deshidratadas natural y artificialmente a los diferentes ca. Semillas de *S. matsudana* con 11% ca, almacenadas durante 11 meses en nitrógeno líquido no mostraron disminución significativa de la germinación (datos no mostrados). Esta tolerancia al nitrógeno líquido fue observada por Pritchard y Seaton (1993) para semillas de vida relativamente corta. Además, el tamaño tan pequeño de las semillas de sauce facilita el empleo de este método.

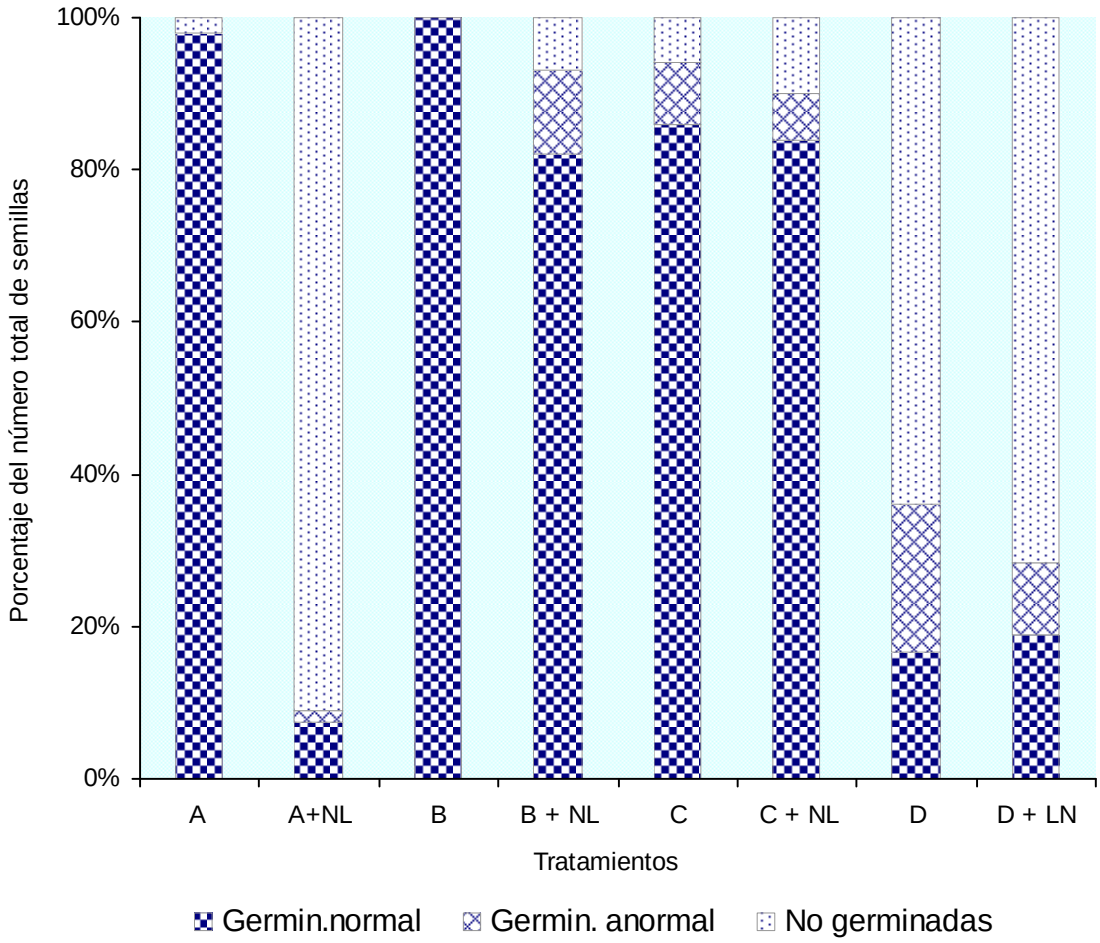


Figura 3.I.1. Germinación (%) de semillas de *S. matsudana* después del tratamiento de deshidratación, cada uno con/ y sin inmediata inmersión en nitrógeno líquido (NL) durante 1 h. **A**, Semillas recientemente liberadas (control): 40% contenido de humedad; **B**, 3 h después de liberadas en condiciones ambientales: 11% contenido de humedad; C, desecadas en solución saturada de LiCl: 6.5% contenido de humedad; **D**, desecadas en solución saturada de H_2SO_4 : 4.4% contenido de humedad. Los valores de barra son promedios de cuatro réplicas de 25 semillas ± DE.

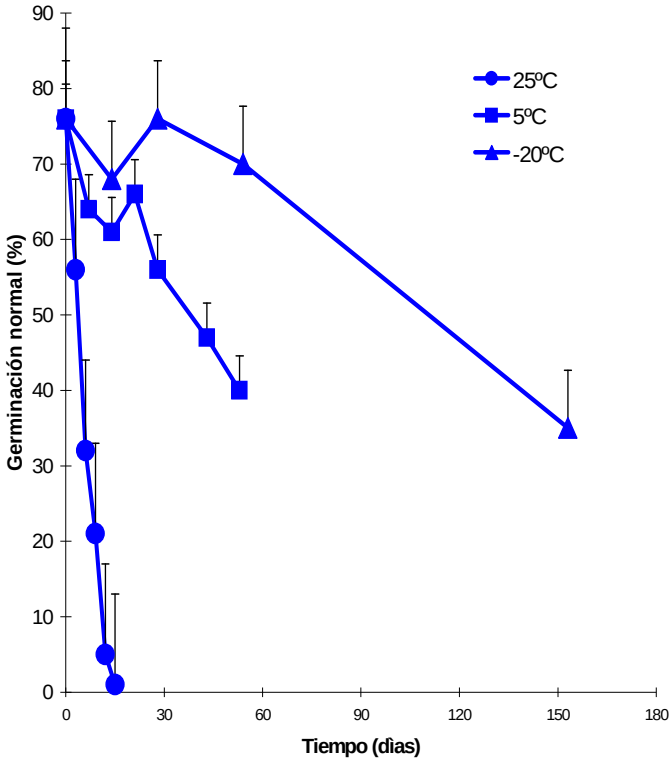


Figura 3.I.2.- Germinación (%) de Salix alba después de ser almacenadas en condiciones de 9% de contenido acuoso y a 25º, 5º y -20 ºC. Los valores son promedios de cuatro réplicas de 25 semillas cada una ± DE.

El efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la longevidad de semillas de *S. alba* con 9% ca se muestra en la figura 3.I.2; la viabilidad se perdió en 2 semanas a 25º C. Sin embargo, la supervivencia de las semillas se extendió a varias semanas a 5º C y a varios meses a –20º C. Semillas de *S. matsudana* con 10.5% ca almacenadas a –70º C mantuvieron sus niveles de germinación inicial hasta 30 meses (Tabla 3.I.2). Como se indicó en la introducción semillas de algunas especies de sauce, entre las que no se encuentran las aquí estudiadas, conservaron porcentajes de geminación relativamente altos durante unos pocos años (Crocker, 1938; Sato, 1955; Zasada y Densmore, 1977, 1980; Simak, 1982; Densmore y Zasada, 1983; Bol'shakow, 1988).

	Germinación (%)		
Meses de almacenamiento	**24 h***	**Normal + Anormal**	**Normal**
6	95 ± 1.8	100	98± 1.4
18	96 ± 4.5	100	95± 3.9
24	100	100	97± 4.5
3	89 ± 9.6	99 ± 3.3	97± 4.5

*Desde la siembra

Tabla 3.I.2.- Germinación (%) de semillas de *S. matsudana* almacenadas durante diferentes períodos a 10.5% de contenido de humedad y –70º C. Los valores son promedios de cuatro réplicas de 25 semillas ± ds

Los resultados aquí obtenidos muestran que la germinación de las semillas de *Salix alba* y *S. matsudana*, recién resultan afectada a muy bajos ca y que la longevidad es mayor cuanto mas baja e la temperaturas. De acuerdo con el criterio que Hong y Ellis (1996) aplican a la caracterización de las semillas ortodoxas (*i.e*. a menor ca y menor temperatura corresponde mayor longevidad) es posible concluir que las semillas de las dos especies investigadas muestran un comportamiento ortodoxo durante el almacenamiento. Esta conclusión concuerda con el comportamiento ortodoxo asignado a las semillas de las otras 28 especies de sauce (Hong y col. 1996). Sin embargo, entre las semillas ortodoxas, aun las menos longevas, se mantienen viables durante al menos unos pocos años a temperatura ambiente, en lugar de decaer tan rápido como lo hacen las de sauce. En este sentido muestran una atipicidad cuyas causas no han sido investigadas y este es unos de los ítems que se trata de aclarar en los siguientes capítulos (Capítulos 3.III y V). Un comportamiento también atípico que detectamos en estas semillas consiste en su respuesta a la humidificación. Este procedimiento se aplica a aquellas semillas cuya germinación se puede ver afectada cuando son puestas a germinar directamente sobre papel mojado. Se considera que la rápida entrada de agua que se produce no da tiempo suficiente para que la membrana plasmática pase de la fase gel, propia del estado deshidratado, a la fase cristal, propia del estado hidratado, que no es afectada por la velocidad de

hidratación. La lenta hidratación que se produce con la humidificación, en cambio, permite que ocurra la transición de fase y, puesta a germinar, la semilla lo hace sin que se vea afectada su germinación.

Al respecto, en semillas de una especie de salicácea, como el álamo, Polya (1961) detectó que con humidificación previa aumentaba el porcentaje de semillas que mostraban GN, hecho que lo atribuyó a que se evitaba daño por imbibición. Este es uno de los pocos antecedentes sobre estudios fisiológicos en semillas de salicáceas y quisimos conocer cual es la respuesta de las semillas de sauce a la humidificación, dado que el comportamiento germinativo es un tema de esta tesis.

En los experimentos se usaron lotes con diferentes porcentajes de germinación inicial, reflejo del grado de envejecimiento de las semillas. El tratamiento de humidificación en los lotes de semillas deterioradas de *S. alba* (Fig. 3.I.3) y *S. matsudana* (Fig. 3.I.4) dieron por resultado primeramente una reducción del porcentaje de GN que fue seguido por un incremento. Por ejemplo, en el lote A de *S.alba* (Fig. 3.I.3), la germinación inicial de 42% se redujo a 33% a las tres primeras horas de tratamiento, mientras que a las 6 h la germinación recuperó, recobrando el porcentaje de germinación inicial (41 %) el que continuó incrementándose hasta superar el 60 %. Un comportamiento similar se insinuó en los lotes B y C, aunque la eventual recuperación quedó inconclusa debido a la falta de semillas.

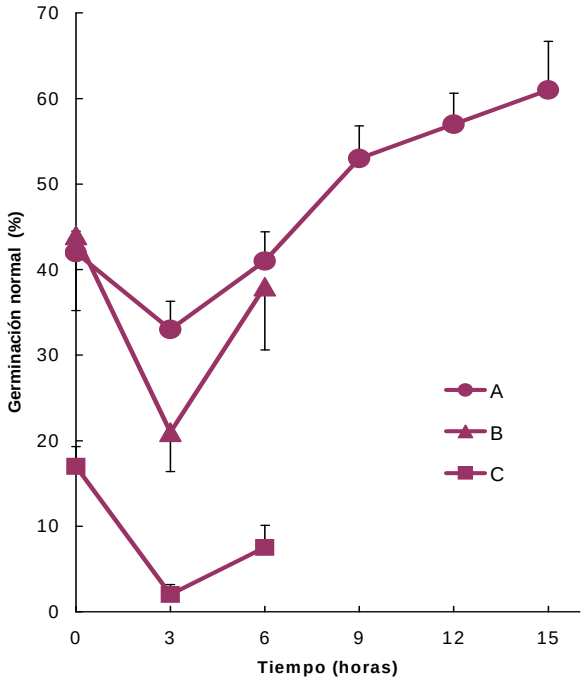


Figura 3.I.3.- Efecto de humidificación a 100% HR y 25ºC sobre la germinación (%) de lotes de semillas *Salix alba* (**A**-**C**) con diferente germinación inicial. El contenido inicial de agua fue 9 %. Los valores son promedios de cuatro réplicas de 25 semillas ± DE.

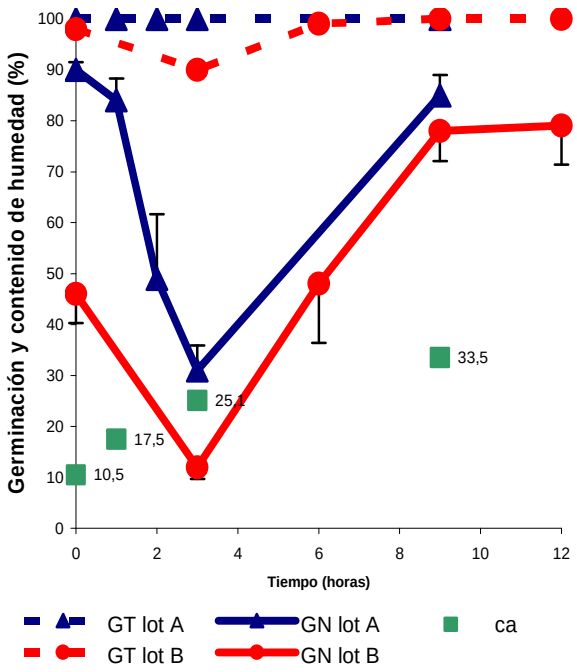


Figura 3.I.4.- Efecto de la humidificación a 100% HR y 17ºC sobre la germinación (%) de lotes de semillas de *Salix matsudana* (**A** y **B**) con diferente germinación inicial. El contenido de agua inicial fue 10.5%. Germinación normal + anormal (G); Germinación Normal (GN). Los valores son promedios de cuatro réplicas de 25 semillas ± DE.

Respecto de las semillas humidificadas de *S. matsudana*, los lotes A y B (Fig. 3.I.4) siguieron un patrón similar. Después de 3 h de humidificación el porcentaje de GN se redujo a la tercera parte: de 90% y 46% a 30% y 15% para los lotes A y B respectivamente. A continuación se produjo un paulatino incremento que llevó a la GN a aprox. 80% para ambos lotes a las 9 horas de humidificación, valor que supera ampliamente el inicial de la GN del lote B. Polya (1971), en cambio, solo detecta un efecto favorable de la humidificación que hace aumentar el porcentaje de GN, lo que también sucede en trabajos de otros autores que emplean el tratamiento de humidificación (Bewley y Black, 1994; Ellis y col., 1990; Pollock, 1969).

En los experimentos llevados a cabo en este estudio, también hubo un incremento de la GN, pero fue posterior a la disminución inicial que alcanzó el valor más bajo a las 3 h de humidificación. En ese momento, el ca promedió 25,1% (Fig. 3.I.4), un nivel que, de acuerdo a Hong y Ellis (1996) excluye la posibilidad de que ocurra daño por imbibición. Además, varias pruebas de germinación hechas con lotes de semillas de ambas especies con ca entre 9 y 12% mostraron 98-100% germinación normal cuando se hicieron sin previa humidificación, lo cual sugiere que no se habían producido daños por imbibición (Tabla 3.I.2, Fig. 3.I.1).

Por otra parte, llama la atención que la GT se haya mantenido prácticamente en 100% a las 3 horas de humidificación, momento en que la GN descendió a su valor mas bajo, dado que en general los valores bajos de GN se corresponden con sensibles disminuciones de la GT, no produciéndose tan alta proporción de GA como lo muestran las Figuras 3.I.4 y 3.I.5. En consecuencia tanto el inicial descenso de la GN, como la falta de correspondencia entre GN y GT durante la humidificación son otros rasgos atípicos que se tratan en los capítulos 3-III y 3-IV.

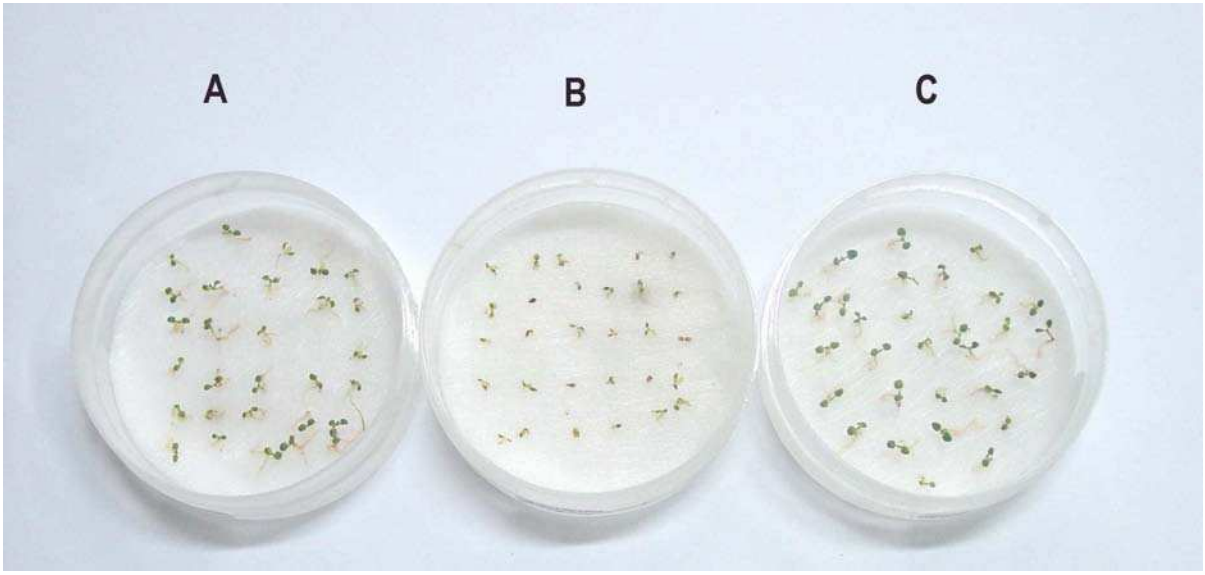


Figura 3.I.5 –Plántulas de semillas de *Salix matsudana* correspondientes al lote B: A, control; B, tres horas de humidificación; C, 9 h de humidificación. Nótese en B que las plántulas muestran marcado desarrollo anormal (reducción de cotiledones, hipocótilo y raíz, tamaño menor y significativa pérdida de clorofila). En C, las plántulas muestran un desarrollo normal, que supera en calidad fisiológica al de las plántulas control.

Los resultados sugieren que algún proceso deteriorativo, diferente a los daños por imbibición, explicarían la disminución observada en la germinación en los comienzos de la humidificación, y que en la posterior recuperación estaría involucrado algún proceso metabólico de reparación. (Burgass y Powell, 1984; Bray y col., 1989; Gray y Drew, 1991; Fujikura y col., 1992). Este comportamiento de las semillas humidificadas de *S. alba* y *S. matsudana* no ha sido previamente reportado para ninguna especie de Salicaceae. Para aclarar estos aspectos, los estudios continuaron en una tercera especie de sauce, *S. nigra* L. y los resultados se muestran en los siguientes capítulos de esta tesis.

CAPÍTULO 3.II

ESTUDIOS HISTOQUÍMICOS Y SUBCELULARES EN SEMILLAS DE *SALIX ALBA, SALIX MATSUDANA, SALIX NIGRA* Y *POPULUS NIGRA*

INTRODUCCIÓN

Las semillas maduras de las especies de Salicáceas tienen un embrión de color verde porque sus tejidos contienen clorofila. La presencia de clorofila en los embriones en desarrollo constituye un carácter bastante común tanto en Monocotiledóneas como en Dicotiledóneas (Yakovlev y Zhukova, 1980); es decir, en la mayoría de las especies, la clorofila aparece en los embriones en los estados globular a torpedo y desaparece cuando las semillas alcanzan la madurez (Klein y Pollock, 1968; Yakovlev y Zhukova, 1980; Bewley y Black, 1994; Dahlgren, 1980; Periasamy y Vivekanadan, 1981; Janzen, 1982; Pretová y Vojteková, 1985; Vertucci y Farrant, 1995). Sin embargo, se ha reportado que las semillas maduras de algunas pocas especies mantienen la clorofila en la madurez. Entre estas especies se pueden mencionar: *Avicennia marina* (Farrant y col., 1992); *Acer pseudoplatanus* (Pinfield y col., 1973); *Kochia childsii* (Marin y Dengler, 1972), *Kochia indica* (El-Shishiny y Thoday, 1953), *Salsola volkensii* y *Aellenia autrania* (Negbi y Tamari, 1963). Existen sin embargo algunas diferencias entre ellas en lo que se refiere al momento en que desarrollan el sistema de tilacoides: en *Avicenia marina* la estructura granal desarrolla apenas poco antes de que las semillas estén maduras para su dispersión, aunque los cloroplastos se muestran totalmente organizados 24 h después de la abscisión del fruto. Los embriones maduros de *Nelumbo nucifera* (Zhukova y Yakolev, 1966) también presentan cloroplastos pero en las semillas maduras el sistema de endomembranas no está organizado en granos.

Hasta el presente, no existen estudios morfológicos, histoquímicos ni subcelulares en semillas de las especies de Salicáceas. En este capítulo se investigan las características estructurales y ultraestructurales de las semillas maduras de tres especies de sauce y una de álamo (*Salix alba* L. y *S. matsudana* Koidz., *Salix nigra* Marsh. y *Populus nigra* L.) usando microscopía de campo claro y electrónica de transmisión. Asimismo

se determina la naturaleza de las principales sustancias de reserva de estos tejidos usando métodos químicos, histoquímicas, físicos. Finalmente se analiza comparativamente el contenido de clorofila de las semillas de *Salix nigra* y de *Populus nigra*. Estos estudios tienen el objetivo de identificar aquellas características que podrían estar relacionadas con el comportamiento atípico de estas semillas durante el almacenamiento (Cap. 3-I).

RESULTADOS

Las semillas contienen lípidos y proteínas como sustancias de reserva. El contenido de lípidos y proteínas totales alcanza valores aproximados de 20 y 34.6 %, respectivamente.

Las semillas de las especies de sauce aquí estudiadas carecen de endosperma en el estado de madurez. Por ello, las semillas consisten de un embrión y una cubierta seminal (Fig. 3.II.1 A). No se encontraron diferencias entre las especies estudiadas. La cubierta seminal consiste de 3-4 capas de células muertas (Fig. 3.II.1 B). La capa externa presenta engrosamientos de lignina sobre las paredes radiales (Fig. 3.II.1 B). La lignina fue identificada con floroglucinol. Las células de las capas subyacentes tienen paredes delgadas y carecen de citoplasma.

El embrión es recto, y consiste de dos cotiledones y un corto eje (Fig. 3.II.1 A). El eje tiene en sus extremos los meristemas apicales del brote y de la raíz. El meristema apical del brote es una estructura cónica en la cual se diferencia la organización túnica-cuerpo, típica de los meristemas apicales del brote de las Angiospermas (3.II.1 C). En este caso la túnica está constituida por una única capa de células. No existen primordios foliares diferenciados. En el ápice meristemático de la raíz se pueden identificar las células iniciales de la caliptra y protodermis, de la corteza y del cilindro central (3.II.1 D).

En los cotiledones como en el eje, se pudieron identificar los tejidos precursores de la epidermis, de los tejidos vasculares y del parénquima, es decir, la protodermis, el procambium y el meristema fundamental. Esta identificación fue posible hacerla, teniendo en cuenta la forma, tamaño y posición de las células del embrión (Fig. 3.II.2 A-E). La protodermis forma una capa continua alrededor de todo el cuerpo de la planta, salvo en los meristemas donde no está diferenciada. Una cutícula delgada se observa siempre sobre la pared externa. En los cotiledones, el meristema fundamental se diferencia en los tejidos en empalizada y esponjoso, el primero, con células alargadas en el eje perpendicular a la superficie; el segundo como células isodiamétricas. En el eje, el meristema fundamental constituye la corteza, y sus células son isodiamétricas. El procambium está constituido por células angostas y alargadas. En los cotiledones, el tejido procambial forma un hacecillo medio del que se separan haces laterales. En el eje, el procambium forma un cilindro central.

Todas las células del embrión tienen paredes primarias. En el citoplasma, pueden identificarse los cuerpos proteicos, los cuerpos lipídicos, mitocondrias, cloroplastos, retículo endoplásmico y el núcleo (3.II.2 A-F, 3.II.4). En las células del meristema fundamental de los cotiledones y del eje, los cloroplastos están bien desarrollados y, ocasionalmente, contienen almidón. En las células del procambium, de la protodermis, y en las células que constituyen los meristemas apicales, los plástidos no están diferenciados como cloroplastos, es decir, carecen de endomembranas, y en ellos es frecuente encontrar depósitos de fitoferritina (Fig. 3.II.3 D-F).

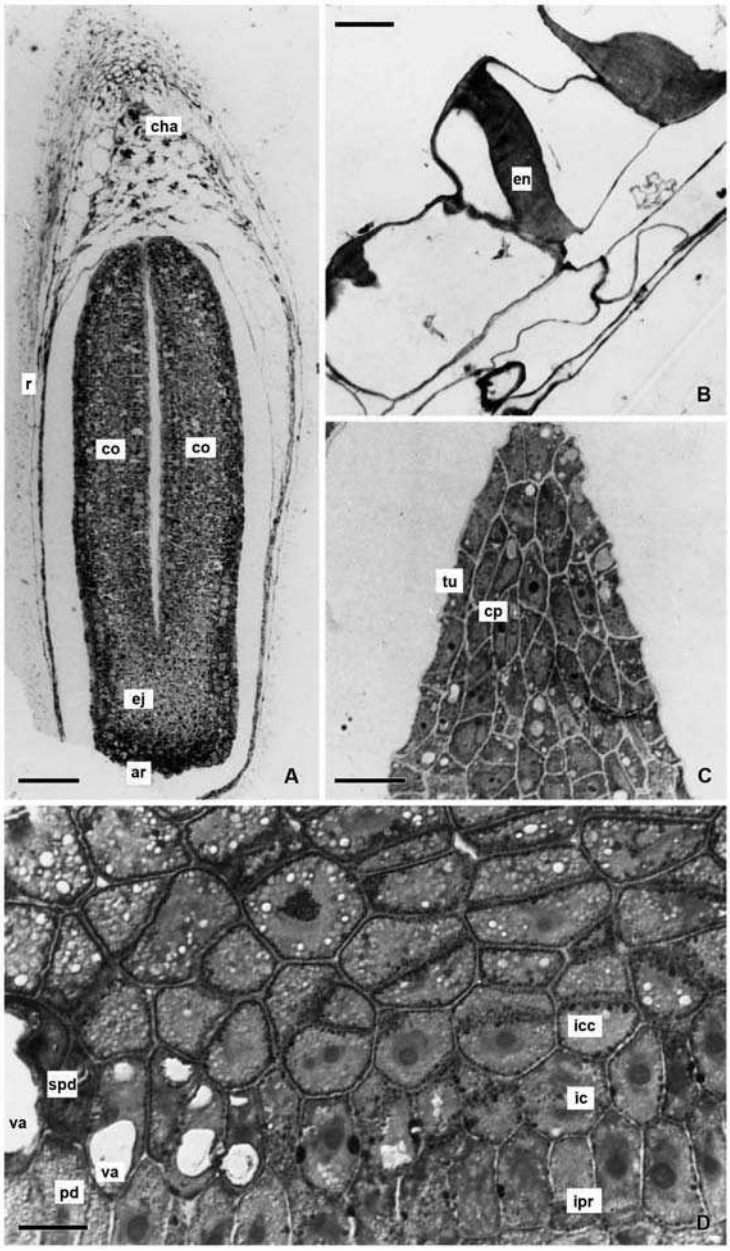


Fig. 3.II.1.- Secciones de semillas maduras de *Salix alba*. **A**, Microscopía de campo claro de una sección longitudinal de la semilla. La sección fue teñida con azul de toluidina. **Escala** = 100 µm. B-C Microscopía electrónica de transmisión. **B**, Tegumento de la semilla. **Escala** = 10 µm. **C**, Sección longitudinal media del ápice meristemático del brote. **Escala** = 10 µm. **D**, Microscopía de campo claro mostrando la organización del meristema apical de la raíz. **Escala** = 10 µm. Abreviaturas: **ar**, ápice de la radícula; **co**, cotiledón; **cp**, cuerpo del ápice meristemático del brote; **cha**, chalaza; **ej**, eje radícula-hipocótilo; **en**, engrosamiento de la pared celular de la exotesta; **ic**, células iniciales del meristema fundamental; **icc**, células iniciales del cilindro central; **ipr**, iniciales de la protodermis y de la caliptra; **pd**, protodermis; **r**, rafe; **spd**, una célula subprotodérmica de la corteza, vacuolizada; **tu**, túnica **va**, vacuola.

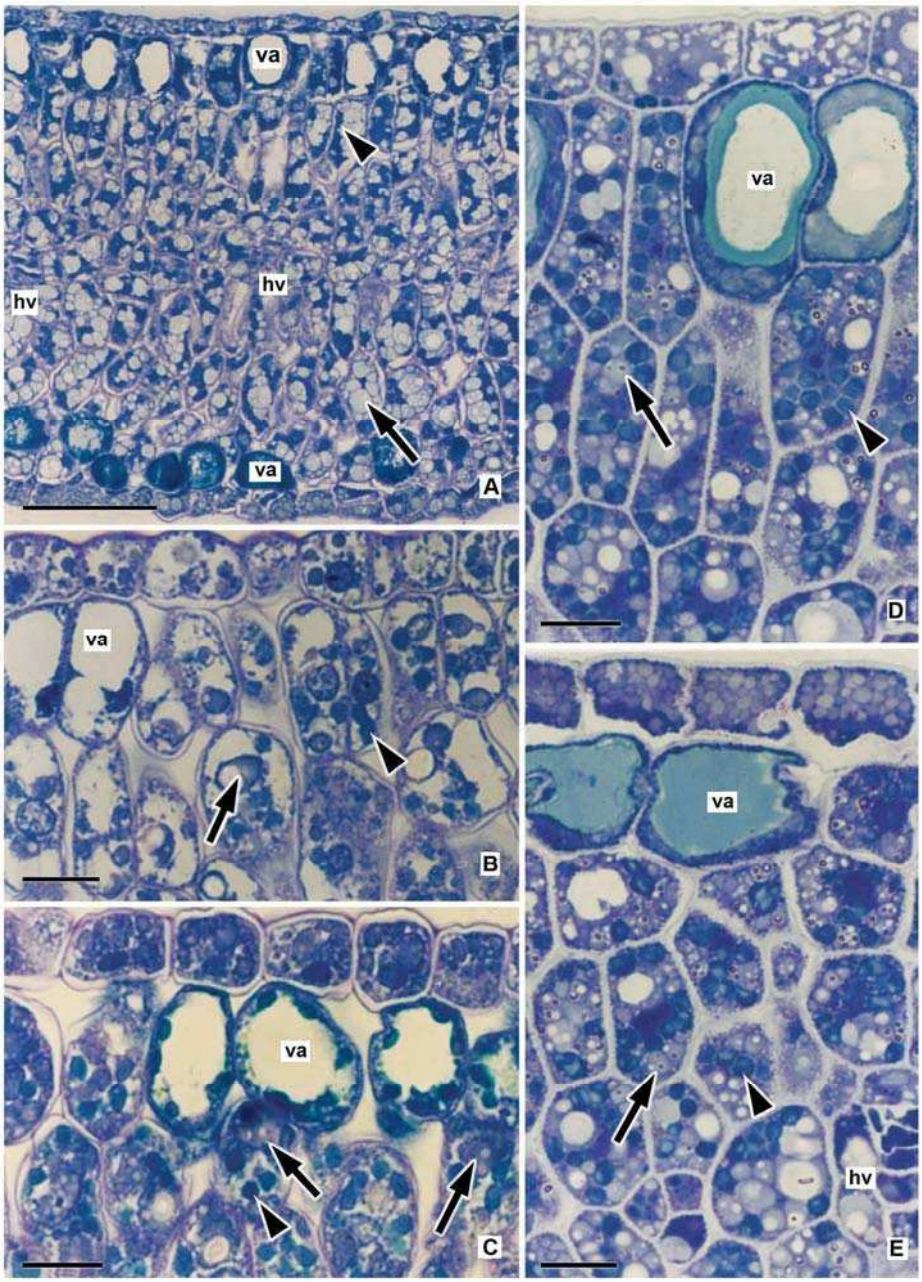


Fig. 3.II.2.- Microscopía de campo claro de los tejidos de los cotiledones de *Salix*. Los cuerpos proteicos (flechas) están presentes en todos los tejidos; contienen uno o más cristales globoides. Algunos de los globoides se han perdido durante la fijación e imbibición, dejando un hueco dentro de la matriz proteica de los cuerpos proteicos. Los cloroplastos (cabeza de flecha) están en los tejidos de empalizada y esponjoso y en algunas células de la protodermis. Las células vacuolizadas se encuentran en la capa subprotodérmica. Las secciones fueron teñidas con azul de toluidina. **A**, Sección longitudinal de uno de los cotiledones del embrión maduro de *S. matsudana*. **Escala**: 20 µm. **B**, **C**, Secciones longitudinales de los cotiledones de embriones jóvenes de *S. alba*., coleccionado 15 días previos al momento de la dispersión (**B**) y coleccionado 7 días precios al momento de la dispersión (**C**). **Escala:** 10 µm. **D**, Sección longitudinal de uno de los cotiledones de una semilla madura de *S. alba*; se observa la protodermis y el tejido de empalizada. **Escala:** 10 µm. **E**, Sección longitudinal de uno de los cotiledones de una semilla madura de *S. alba*. Se muestran la protodermis y el tejido esponjoso. **Escala**: 10 µm . (**hv**, hacecillo vascular; **va**, vacuola).

Los cuerpos proteicos contienen 2 o más globoides, salvo en las células de la protodermis, en las cuales los globoides frecuentemente están ausentes. En los globoides, el uso de energía dispersiva de rayos X permitió detectar P, K, Mg y Ca como sus principales constituyentes (Fig. 3.II.5 A-B). Los cuerpos lipídicos están dispuestos en proximidades de la membrana plasmática y también están distribuidos alrededor de los cuerpos proteicos (Fig. 3.II.3 A-D). La presencia de proteínas fue determinada por tinción con azul brillante coomassie, ácido fucsínico y fast green FCF. La presencia de los lípidos fue determinada por tinción con Sudan black B.

Una característica peculiar encontrada en el embrión de sauce fue la presencia de células con una amplia vacuola central, que desplaza el citoplasma y organelas contra la pared; estas células vacuolizadas que, llamativamente sólo se encuentran en la capa sub-protodérmica, alternan de manera irregular con las células reservantes (Fig. 3.II.2 A-E). En algunos casos se identificaron taninos y sales de oxalato de Ca en esas vacuolas.

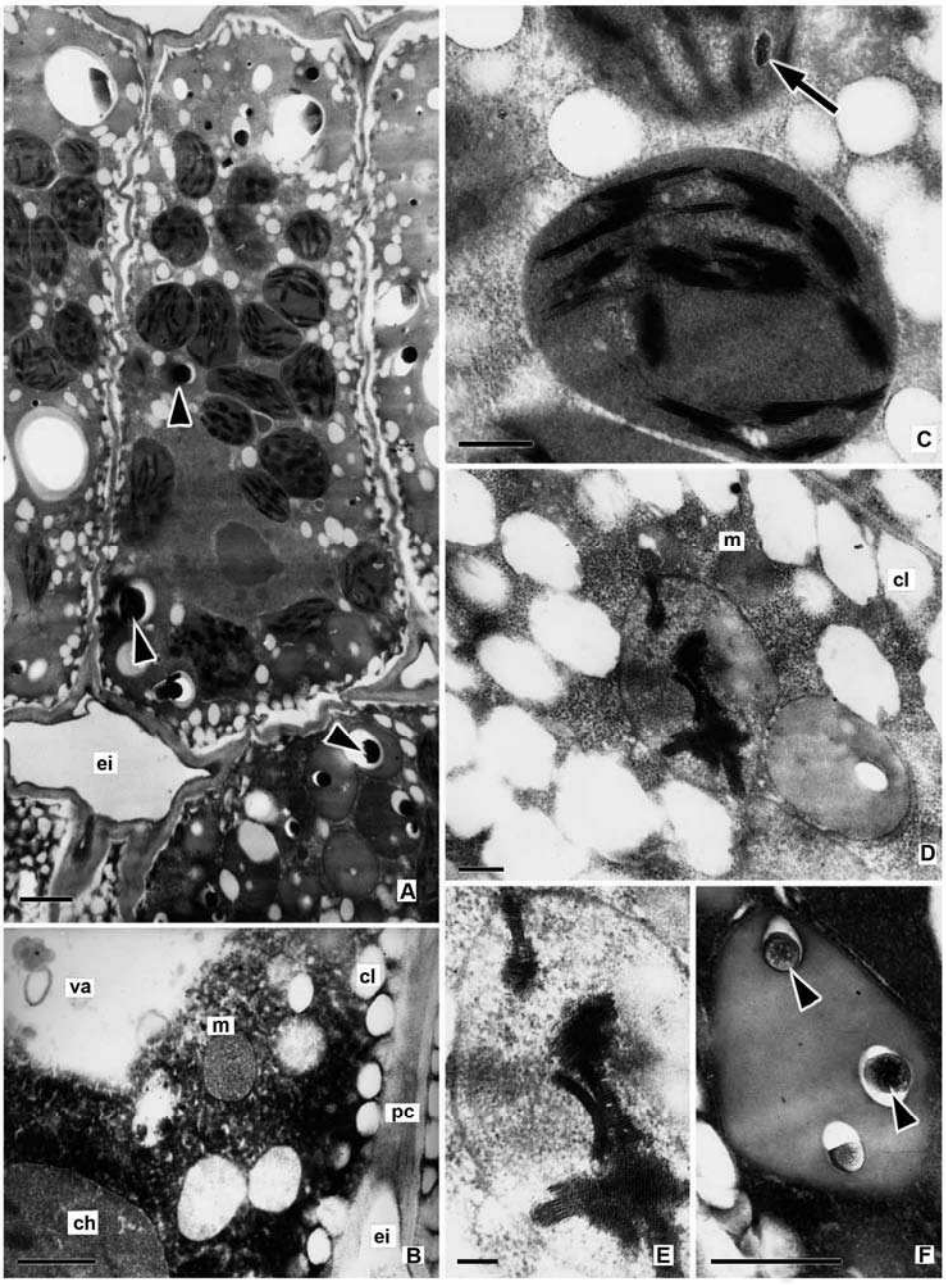


Fig. 3.II.3.- Micrografías obtenidas con microscopía electrónica de transmisión, de los tejidos embrionarios de una semilla madura. **A**, células del tejido de empalizada de *S. alba*. **Escala:**: 2 µm. **B**, Células vacuolizadas del tejido esponjoso de *S. alba*. **Escala:** 1 µm. **C**, detalle de uno de los cloroplastos de la figura **A**. Uno de los cloroplastos contiene un pequeño grano de almidón (flecha). **Escala:** 0.5 mm. **D,** Plástidos del tejido meristemático del ápice del brote de un embrión de *S. matsudana*. Puede ser observado un depósito de fitoferritina en su característico arreglo cristalino. **Escala:** 0.2 µm. **E**, Detalle de plástidos mostrando depósitos de fitoferritina. **Escala**: 0.1 µm. **F,** Cuerpo proteico de una célula del tejido de empalizada de una semilla de *S. alba*. La imagen muestra un cuerpo proteico el cual consiste de la matriz y de 3 cristales globoides (cabeza de flecha). **Escala:** 1 µm. Las secciones fueron coloreadas con acetato de uranilo seguidas por citrato de plomo (**ch,** cloroplasto; **cl**, cuerpo lipídico; **ei,** espacio intercelular; **m,** mitocondria; **pc**, pared celular; **va,** vacuola).

El análisis de la clorofila del embrión de *Salix nigra* y *Populus nigra* reveló la presencia de Chl *a* y Chl *b*. El estudio que determina la absorbancia leída con un espectrofotómetro, permitió determinar que la clorofila total fue mayor en los embriones de sauce que en los de álamo y en cambio la relación Chl *a*/Chl *b* fue casi el doble en los embriones de álamo, comparados con los de sauce (Tabla 3.II.1)

	GN	**Chl *a***	**Chl *b***	**Chl *a* /Chl *b***	**Chl total**
	%	**µg/mg de peso seco**			
Salix nigra	94	2.08	1.4	1.48	3.14
Populus nigra	95	0.21	0.08	2.62	0.29

Tabla 3.II.1.- Concentraciones de clorofila (µg/mg de peso seco de tejidos seminales) y la relación Chl *a/b* en semillas de *Salix nigra* y *Populus nigra.* GN: germinación normal

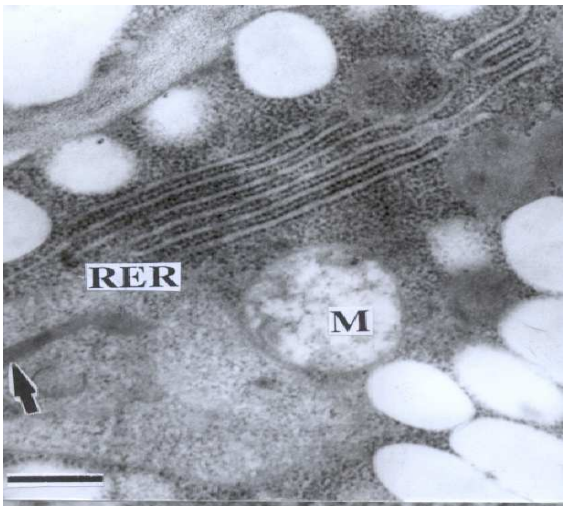


Fig. 3.II.4.- Micrografía obtenida con microscopía electrónica de transmisión de una célula del ápice meristemático de la raíz del embrión de *Salix nigra.* En esta parte del citoplasma pueden observarse el retículo endoplásmico rugoso en cisternas apiladas, una mitocondria, y varios cuerpos lipídicos. La flecha indica un depósito de fitoferritina en un proplástido. **Escala**: 1 µm.

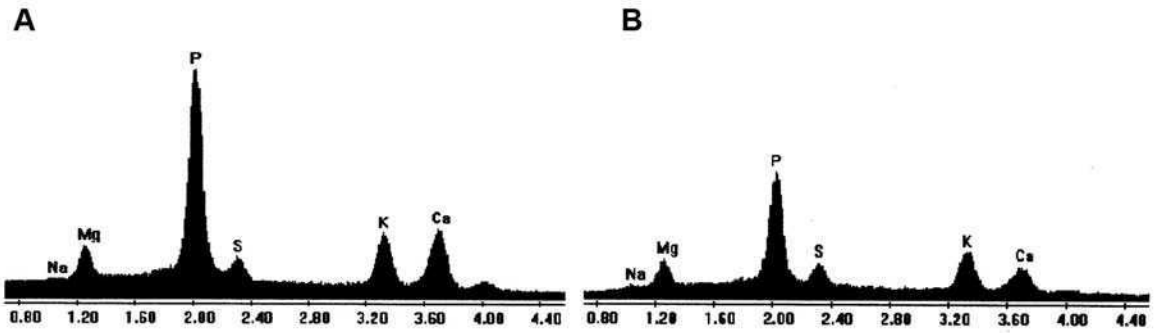


Fig. 3.II.5.- Espectros de los análisis EDX de los globoides encontrados en cuerpos proteicos de células de empalizada de cotiledones de *Salix alba* (**A**) y *Salix matsudana* (**B**)

DISCUSIÓN

Nada se conocía sobre las características subcelulares de los tejidos embrionarios de las especies de Salicáceas y en la bibliografía solo aparece reportado que las semillas son verdes, es decir los tejidos embrionarios contienen clorofila en su madurez. Es cierto que los embriones en desarrollo de muchas especies de plantas son verdes debido a la presencia de cloroplastos similares a los cloroplastos de las hojas; sin embargo, estos embriones clorofílicos se vuelven aclorofílicos en la madurez. Es decir, el estado clorofílico existe, en la mayoría de los casos, sólo durante el desarrollo del embrión (Dahlgren 1980; Yakovlev y Zhukova 1980; Janzen 1982; Vertucci y Farrant 1995). Cloroplastos y clorofila han sido encontrados en los embriones maduros de muy pocas especies: *Nelumbo nucifera* (Zhukova y Yakolev 1966), *Kochia childsii* (Marin and Dengler 1972), *Acer pseudoplatanus* (Pinfield y col. 1973), *Avicennia marina* (Farrant y col. 1992, 1997) y *Ekebergia capensis* (Pammenter y col. 1998). Las semillas de *Nelumbo nucifera* tienen larga vida (Priestley 1986) aunque cabe la duda de que el estudio de Zhukova y Yakolev (1966) se base en semillas totalmente maduras. En *Acer pseudoplatanus, Avicennia marina y Ekebergia capensis* las semillas son categorizadas como recalcitrantes (Pinfield y col. 1973; Farrant et al 1992; Pammenter et al 1998). El comportamiento durante el almacenamiento de *Kochia childsii* es desconocido. Las semillas de las especies de *Salix* que aquí se estudian son ortodoxas con un período muy corto de viabilidad (Capitulo 3-I.de esta tesis) ellas presentan cloroplastos con grana bien desarrollada y frecuentemente almidón en el estroma, es decir cloroplastos similares a los encontrados en las semillas maduras de *Nelumbo nucifera*, *Acer pseudoplatanus*, *Avicennia marina, Ekebergia capensis* y *Kochia childsii*. Teniendo en cuenta las especies mencionadas incluidas las de Salicáceas, es posible inferir que la presencia de cloroplastos en los embriones maduros no parecería estar asociada con el comportamiento de las semillas durante el almacenamiento.

La presencia de clorofila y de cloroplastos con grana sugiere que los cotiledones de sauce (y de las otras especies mencionadas con similares características) son capaces de cumplir su rol de órganos fotosintetizantes mas temprano durante la germinación que en todas aquellas especies (que son la mayoría)

en las cuales debe producirse el desarrollo de la grana y la síntesis de clorofila antes que la fotosíntesis pueda ser activada, lo que ocurre después de la imbibición.

La relación Chl *a*/Chl *b* de aproximadamente 3-4 es reportado para hojas normales de diferentes especies adaptadas a crecer en altas intensidades de luz. De acuerdo a Palanisamy (1989) y Pretová y Vojtekova (1985), la relación Chl *a*/Chl *b* es más baja en embriones verdes que en hojas normales. Sin embargo, en embriones de *S. nigra* y de *Populus nigra*, con valores de 1.48 y de 2.62, respectivamente, los valores resultaron similares a los encontrados en hojas normales de especies adaptadas a crecer en bajas intensidades de luz, condición en la cual la actividad fotosintética es más alta (Thornber 1975). Esto sugiere que la clorofila encontrada en las semillas de sauce y álamo ayudaría en la emergencia y crecimiento de las diminutas plántulas, probablemente ensombrecidas por la vegetación que la rodea.

La fitoferritina, proteína que almacena el hierro, juega su rol en el metabolismo del hierro (Harrison y Arosio 1996). La fitoferritina se encuentra especialmente en los plástidos de los tejidos agranales de los meristemas apicales del brote y la raíz y, menos frecuentemente, en los cloroplastos granales del resto de los tejidos embrionarios. La fitoferritina en tejidos seminales ha sido reportada en proplástidos de cotiledones de algunos miembros de Fabaceae, i.e. *Pisum sativum* L. (Lobreaux y Briat 1991), *Vicia faba* L. (Johansson y Walles 1994) y *Cercis siliquastrum* L. (Baldan y col. 1995) y de Chenopodiaceae, i.e. *Chenopodium quinoa* Willd. (Prego y col. 1998). También la fitoferritina fue encontrada en el endosperma de *Myrsine laetevirens* (Otegui y col. 1999). La presencia de fitoferritina en los proplástidos y su carencia en los cloroplastos, sugiere que en el proceso de transformación de una organela en la otra, el Fe de la fitoferritina es usado en la síntesis de proteínas y enzimas del sistema fotosintético que lo contiene.

Además de la presencia de cloroplastos desarrollados, las células de los tejidos embrionarios de sauce retienen en su madurez un complejo sistema de membranas, esto es, el reticulo endoplásmico rugoso y las mitocondrias con crestas parcialmente desarrolladas. Estas características hasta el momento habían sido reportadas sólo en semillas recalcitrantes (Farrant, y col. 1989; 1992). En las semillas ortodoxas, en cambio, se produce una desdiferenciación de cloroplastos y mitocondrias y una reducción general de membranas en

los últimos estados del desarrollo de las semillas. Es entonces que las semillas de sauce se apartan de las categorías tradicionalmente reconocidas en semillas y confirman la hipótesis de que las mismas conforman un modelo diferente.

En cuanto a las reservas, se identificaron lípidos, proteínas y minerales. Los cuerpos lipídicos fueron detectados entre los cuerpos proteicos y en contacto con la membrana plasmática. De acuerdo a Vertucci y Farrant (1995), estos cuerpos lipídicos están presentes en las células de los embriones de semillas recalcitrantes y ortodoxas cumpliendo las funciones de reserva y su función se asocia con la necesidad de reparar y construir membranas al inicio de la imbibición.

En las semillas típicamente ortodoxas, la vacuola central está ausente en las células de todos los tejidos embrionarios (Vertucci y Farrant 1995). Vacuolas grandes que ocupan una posición central en las células, es decir, células diferenciadas, fueron observadas en todos los tejidos de los cotiledones y eje de *Avicennia marina, Landolphia kirkii* y *Scadoxus membranaceus* (Farrant y col. 1989; Berjak y col. 1992; Farrant y col. 1992), todas ellas con semillas recalcitrantes. Las semillas de las especies de *Salix* aquí estudiadas, tienen vacuolas en algunas de las células de la capa sub-protodérmica de eje y cotiledones; en este aspecto entonces, estas semillas se diferencian no sólo de las semillas ortodoxas sino también de las semillas recalcitrantes. En este punto parecería interesante abordar en el futuro, investigaciones orientadas a investigar las razones por las cuales sólo algunas de las células de la capa subprotodérmica mantienen sus vacuolas; este hecho es totalmente novedoso en la bibliografía de semillas.

CAPITULO 3-III

REACCIONES QUÍMICAS DE DETERIORO EN LAS SEMILLAS SECAS

INTRODUCCIÓN

Las semillas típicamente ortodoxas muestran longevidad de varios años (Roberts, 1973). Como se señaló en el capítulo 1 (Maroder y col., 2000), se considera que las principales reacciones químicas de deterioro que ocurren durante el almacenamiento de las semillas ortodoxas son lentas reacciones de oxidación y de Maillard que proceden a bajos contenidos de agua (Priestley, 1986; Wilson y McDonald, 1986; McDonald, 1999). Debido a que las semillas de sauce decaen en pocas semanas a temperatura ambiente, esas consideraciones resultan insuficientes para explicar el rápido deterioro. Al respecto, cabe mencionar que si bien el bajo contenido de agua impide la actividad de la enorme mayoría de las acciones enzimáticas y hacen necesariamente lentas las que no los son, como autooxidaciones, Maillard (Wilson y McDonald, 1986; Vertucci y Leopold, 1987; Ponquett y col., 1992), estudios relativamente reciente en el área de las semillas, que derivan de investigaciones sobre conservación de alimentos muestran que, en las semillas longevas, la matriz citoplásmica se encuentra en un estado de alta viscosidad o baja porosidad lo que determina una movilidad molecular reducida y por ende que las reacciones de deterioro sean lentas y las semillas, longevas. Cabe preguntarse entonces si, al menos en parte, la brevísima longevidad de las semillas de sauce no se debería a que el estado de la matriz citoplásmica es poco viscoso o muy poroso permitiendo así que las reacciones mencionadas no resulten lentas y contribuyan al rápido deterioro. Por otra parte, el capitulo 3.II muestra que otro rasgo atípico de estas semillas es que en estado seco conservan cloroplastos con clorofila lo que induce a pensar que la luz podría jugar un rol como agente deteriorante (Capítulo 3-II; Maroder y col., 2003). En tejidos verdes frescos, si bien el rol fundamental de la clorofila excitada por la luz se cumple en el proceso fotosintético, ésta también puede activar el oxígeno molecular ya sea directamente por transferencia de la energía de excitación formando oxígeno singulete, o indirectamente por transferencia de electrones formando radical superóxido. Ambas especies de oxígeno dan lugar a la generación de radicales

libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (EROs) (Asada, 1994; Dalton, 1995; Foyer, 1996).La formación mediada por la luz de estas especies, que son importantes agentes de daños metabólicos en sistemas biológicos, se conoce como fotooxidación. En tejidos vedes secos, en cambio, como es el caso de los tejidos de los embriones de las semillas de Salicáceas, aún cuando la activación del oxígeno ha sido muy poco estudiada, se descarta que se forme radical superóxido debido a que esta especie radicalaria se origina en la cadena de transporte de electrones del proceso fotosintético que no es operativa en estado seco. En dicho estado, la energía de la clorofila activada puede originar oxígeno singulete, disiparse como luz de mayor longitud de onda o como calor (Taiz y Zeiger, 1998).

De lo hasta aquí considerado surge que dos procesos no excluyentes entre sí podrían explicar, al menos en parte, el rápido deterioro de estas semillas. Uno de ellos sería la existencia de una movilidad molecular relativamente alta y el otro un proceso fotooxidativo generador de importantes daños oxidativos. En este capítulo se estudiará el rol que tiene el proceso fotooxidativo y en el capítulo 3.IV el rol que tiene la movilidad molecular y/o la porosidad en el atípico comportamiento de estas semillas.

En este estudio se utilizaron semillas de otra especie de sauce, *Salix nigra*, en las que estudios previos demostraron tener un comportamiento y características similares al las de *S. alba* y *S. matsudana* utilizadas en los capítulos anteriores. Se emplearon métodos complementarios para estudiar el papel que tendría la clorofila en la corta viabilidad que caracteriza a las semillas de sauce. Se propone que RL y EROs generados como consecuencia de la acción de la luz produciría primeramente una intensa peroxidación lipídica en las membranas tilacoides dado que son particularmente ricas en ácidos grasos poliinsaturados y en ellas se encuentran los complejos fotosintéticos que contienen clorofila; desde allí el daño oxidativo se propagaría a otros componentes, membranas y estructuras celulares (Cuadro 3). Debido al estado deshidratado en que se encuentran las semillas, las defensas moleculares contra esos agentes oxidantes serían insuficientes y/o poco eficaces, y las defensas enzimáticas estarían inactivas por la misma razón (Nandi y col., 1997; Bailly, 2004).

Dado que no existen estudios en semillas que decaigan tan rápidamente, algunos aspectos se cotejaron con la información derivadas de estudios en especies de líquenes (Seel y col., 1991) por contener éstos clorofila y ser particularmente tolerantes a la deshidratación lo que, desde este punto de vista, haría semejante sus tejidos a los de la semilla de sauce

Para demostrar la propuesta anteriormente delineada, en lotes de semillas envejecidas a diferentes intensidades de luz y composición de atmósfera, se investigó la producción de RL por espectroscopia de resonancia de espín electrónico (Electronic Spin Resonance Spectroscopy-ESR) y cuatro indicadores de daños moleculares fueron monitoreados: peroxidación lipídica, destrucción de pigmentos, oxidación de proteínas y formación de productos de Maillard además, se evaluó la integridad de las membranas tilacoides y plasmáticas. Estas determinaciones fueron acompañadas por la determinación de la germinación normal (GN), germinación total (GT) y el tiempo medio de germinación (TMG).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las figuras 3.III.1 y 3.III.2 muestran que hubo una alta correlación entre GN y TMG ($R^2 = 0.97$, $\alpha \leq 0.01$) así como también entre cada una de ellas y la producción de radicales libres (RL) (GN/RL $R^2 = 0.94$ y TMG/RL $R^2 = 0.98$, $\alpha \leq 0.01$).

Los resultados mostrados en la Figura 3.III.1 muestran que la luz y el oxígeno promueven el decrecimiento de la GN y el incremento de TMG, manteniéndose la GT inalterada.

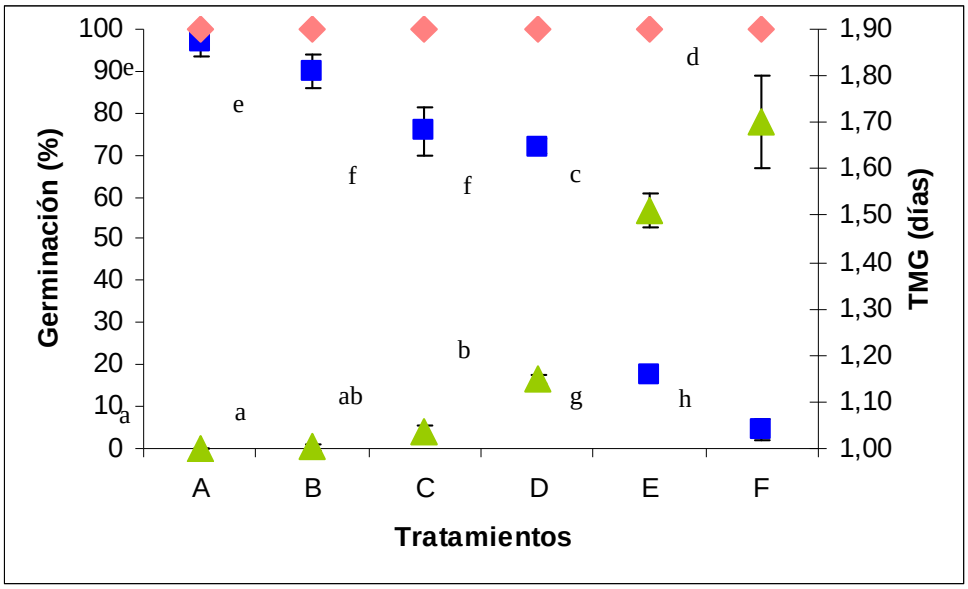


Figura 3.III.1.- Semillas de *Salix nigra* sometidas a 25 º C y 45 % HR durante tres días: **A**, control. **B-F**, diferentes tratamientos: **B**, oscuridad y atmósfera N_2; **C**, oscuridad y aire; **D**, luz (140 lux) y atmósfera de N_2; **E**, luz (140 lux) y aire; **F**, luz (1300 lux) y aire. Germinación Normal (GN) (■), Tiempo Medio de Germinación (TMG) (▲) y Germinación Total (TG) (♦). Tratamientos con la misma letra minúscula son no significativamente diferentes a P = 0.05 por el test de Tukey.

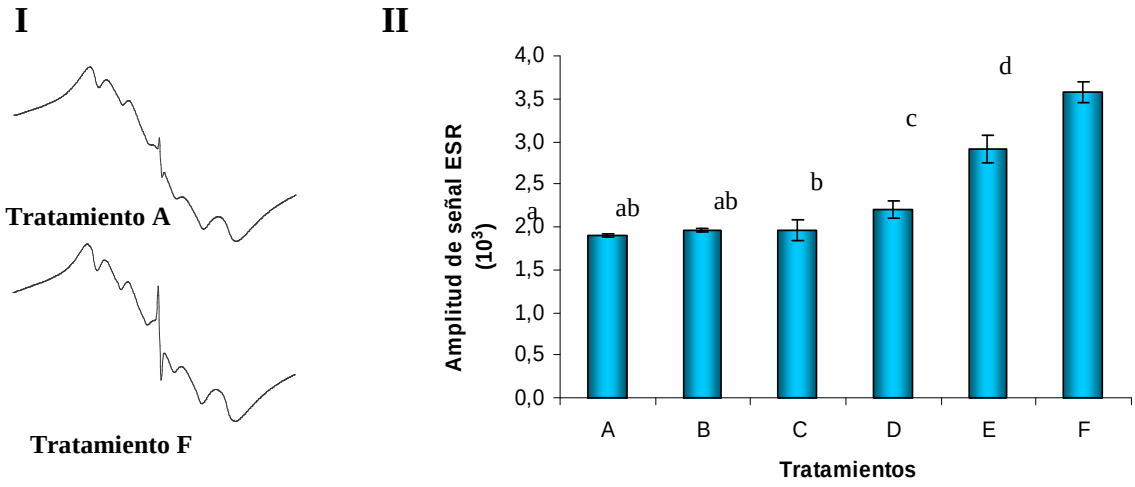


Figura 3-III-2.- I, Espectros de ESR correspondientes a los tratamientos A - F. II, La amplitud de las señales ESR de semillas de *Salix nigra* en las diferentes condiciones de almacenamiento descriptas en figura 1. Los tratamientos con la misma letra minúscula encima de las columnas no son significativamente diferentes en P = 0.05 por el test de Tukey.

En estas semillas fue evidente la inducción de RL por la luz (Fig. 3.III.2 tratamiento E y F), y también fueron detectados en las semillas correspondientes a los demás tratamientos y en las semillas control. En los líquenes *Tortula ruraliformis* y *Dicranella palustris* la luz también induce un importante cantidad de radicales libres que superan la del control (Seel y col., 1991). Las semillas control de sauce con casi 100% de GN, mostraron contener una importante cantidad de RL, aproximadamente la mitad de la encontrada en las semillas cuya GN había descendido casi a 0% (Fig 3.III.2 A y F). Estos resultados admiten dos interpretaciones: (i) tal cantidad de RL no afecta la GN; (ii) el nivel de RL podría ser reducido y reparado el daño por ellos causado, como consecuencia de la actividad tanto de las defensas antioxidantes como de los mecanismos de reparación, procesos que se activan con la hidratación. Estos RL pudieron haberse formado por dos vías: (i) a partir del radical superoxido que se puede formar al pasar los electrones de la cadena respiratoria directamente al oxígeno, como consecuencia de la desregulación del proceso respiratorio que ocurre durante la deshidratación de la semilla (Vertucci y Farrant, 1995; Bailly 2004); (ii) debido a la alta

sensibilidad a la luz que muestran estas semillas (ver más adelante en este mismo capítulo), es probable que los RL también hayan podido formarse durante el lapso transcurrido desde que las semillas comenzaron a ser expulsadas del fruto hasta que se recolectaron, a pesar de que se mantuvo baja la intensidad de la luz durante dicho lapso.

En cuanto a los diferentes tratamientos, el B (Luz-Nitrógeno) no muestra diferencias significativas con el control (Fig. 3.III.1). El decrecimiento de la GN en el tratamiento C reflejaría el daño que se genera a partir de la reacción del oxígeno con los radicales pre-existentes (Ohlrogge y Kernan, 1982;Justin y Bass, 1978) y/o con los ácidos grasos poliinsaturados (autooxidación) sobre todo teniendo en cuenta que las semillas fueron tratadas durante tres días a 25º C, temperatura que promueve el envejecimiento (Capítulo 3-I; Maroder y col., 2000). La disminución de la GN que se produjo en el tratamiento D (Luz-Nitrógeno) podría deberse, según a Benson (1990), a la clorofila excitada por la luz que reaccionaría directamente con el sustrato para formar radicales libres sin ser el oxígeno parte de la reacción. Sin embargo, la formación de algunos oxi-radicales (EROs) no se puede descartar debido a que la remoción del oxígeno por el nitrógeno pudo haber sido incompleta. El decrecimiento de la GN por efecto de los RL queda claramente mostrada en los tratamientos con luz-aire (E y F): a 140 lux (E) se produjo un incremento del 53% de los RL (de 1900 a 2900 UA) y una disminución del 81% de la GN (de 97 a 18%) con respecto al control. Esto sugiere que, aún a tan baja intensidad de luz, ocurrió un fuerte proceso fotooxidativo. Llama la atención que una intensidad de 140 lux indujera una disminución del 81 % de la GN mientras que una intensidad aproximadamente diez veces mayor (tratamiento A y F Fig. 3.III.1 y 2) no resultara suficiente para anularla ni tampoco llegara a afectar la GT. Al respecto, dos hechos merecen señalarse: (i) La baja intensidad de luz resultó proporcionalmente más eficaz que la alta en disminuir la GN, y (ii) Si bien el curso del decaimiento de la GN siempre antecede al de la GT, durante la mayor parte de ese curso ambas germinaciones decaen simultáneamente (Sivritepe y Dourado, 1995; Ellis y Roberts, 1981; Sun y Leopold, 1995) (ver cuadro 3.III.2); en cambio, en las semillas de sauce que envejecen por la acción de la luz y del oxígeno, la GN y GT no decaen necesariamente en forma

simultánea sino que la última puede comenzar a decaer una vez que la primera ya se anuló (Fig. 3.III.1 y 3.III.10).

Ambos hechos (i) y (ii) podrían explicarse al analizar el proceso de fotooxidación tal como parece ocurrir en estas semillas. El ataque de los radicales libres inducidos por la luz en presencia del oxígeno comenzaría en los tejidos superficiales del embrión. Debido a que esta semilla consiste de un embrión cubierto por un tegumento tenue y transparente (Maroder y col., 2003), los tejidos más superficiales, es decir, los del lado abaxial de los cotiledones, los tejidos más externos del eje y el ápice de la radícula, son los que resultan dañados en estas condiciones. Este daño que se produce en las semillas secas, durante la germinación se manifiesta en un desarrollo anormal de la raíz y en el desarrollo de cotiledones con irregularidades en tamaño y color, aspectos que son tenidos en cuenta para evaluar la GN. Desde los tejidos superficiales el daño oxidativo se propagaría hacia los más internos de manera que hasta tanto no alcance el meristema apical del brote, éste quedaría protegido, posponiéndose en consecuencia, el descenso de la GT (inicio de la mortalidad de las semillas). Cuando el daño lo alcanza, ya la GN se hubo anulado. Esta sería la razón por la cual GT y GN no decaen simultáneamente. Este comportamiento difiere del que muestran las semillas ortodoxas típicas, debido a que en éstas el deterioro no comienza por los tejidos superficiales del embrión sino que ocurre simultáneamente en todos los tejidos del mismo aunque con diferencias de intensidad entre ellos (Ellis y Roberts, 1981), lo que determina que las curvas de decaimiento de ambas germinaciones (GN y GT) se superpongan en su mayor parte.

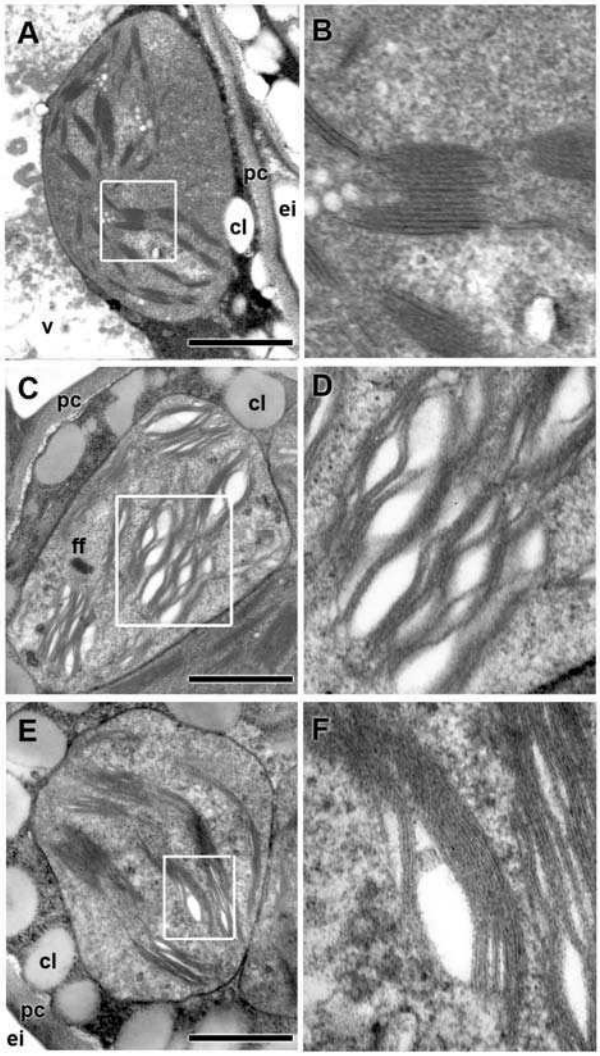


Figura 3.III.3.- Imágenes de MET mostrando los daños generados por la luz en los cloroplastos de *Salix nigra*. **A**, En una semilla control, un cloroplasto de una célula subprotodermal (lado abaxial) del cotiledón. **B**: detalle de A; **C** y **E**, Semilla expuesta durante tres días a 25 º C y 1300 lux. **C**, cloroplasto de una célula subprotodermal (lado abaxial). **D**, detalle de C. **E**, Cloroplasto de una célula del mesófilo central de un cotiledón. **F**, detalle de E. Note las diferencias en el estado de las membranas tilacoides entre las figuras C y E. **Abreviaturas**: **pc**, pared celular; **ei**, espacio intercelular; **cl**, cuerpo lipídico; **df**, depósito de fitoferritina; **v**, vacuola. **Escala** = 1 µm

Esta interpretación de los hechos basada en un proceso oxidativo que se inicia en los tejidos superficiales y se propaga hacia los más internos permitiría también explicar la razón por la cual una intensidad de 140 lux disminuye la GN al 20%, mientras que una intensidad aproximadamente diez veces mayor no sólo no la anula sino que tampoco llega a afectar la GT. En este sentido, 1300 lux producirían un

daño en los tejidos superficiales lo suficientemente intenso como para destruir clorofila y otras moléculas (Ver Capítulo 3-II de esta tesis) y reducir la penetración de la luz y la capacidad fotoactivable del tejido. En consecuencia, el efecto de la luz sobre la GN y la presencia de RL no guardarían relación con su intensidad. Esta interpretación de la fotooxidación que ocurre en estas semillas recibe sustento de los estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Fig 3.III.3). En las semillas expuestas a 1300 lux durante tres días, los efectos detrimentales de la luz afectaron especialmente los tejidos superficiales del embrión como la epidermis y las capas subyacentes del parénquima clorofílico (Fig. 3.III.3). El daño fue claramente visible en los cloroplastos de las células de estos tejidos, especialmente en las membranas tilacoides. En efecto, los tilacoides granales aparecieron dilatados, formando vesículas intergranales, y las membranas tilacoides mostraron pérdida de definición (Fig. 3.III.3 A-F). Por el contrario, fueron observadas sólo ligeras alteraciones en los cloroplastos del mesófilo central y lado adaxial de los cotiledones (Fig. 3.III.3 C y D) y ningún daño en los cloroplastos de los tejidos centrales del eje y del meristema apical del brote. Esto explicaría la razón por la cual a los tres días la GT aún no resultó afectada (Fig. 3.III.1 E-F), si bien las plántulas que generaron estas semillas mostraban síntomas que hacían disminuir el porcentaje de GN como: (i) Plántulas más pequeñas, (ii) Radículas poco desarrolladas; (iii) Cotiledones con áreas de color marrón-rojizas (en lugar de verdes) en su superficies abaxiales y en los bordes (Fig. 3.III.4). Como ya se mencionara, por ser estas dos áreas junto con el meristema apical de la raíz, incluyendo la caliptra, las partes más externas del embrión, son también las más expuestas a la acción detrimental de la luz incidente (consecuentemente, las más afectadas). Por lo tanto, los tejidos más internos, esto es, los del lado adaxial de los cotiledones (epidermis adaxial y mesófilo subyacente), los centrales del eje, y el meristema apical del brote, resultaron poco o nada afectados. Por otro lado, las semillas envejecidas en oscuridad generaron plántulas que, en comparación con las semillas control, fueron de tamaño algo menor y sus cotiledones mostraron un color verde pálido (Fig. 3.III.4 C). Los efectos de la luz fueron más débiles en semillas expuestas a 140 lux (datos no mostrados).

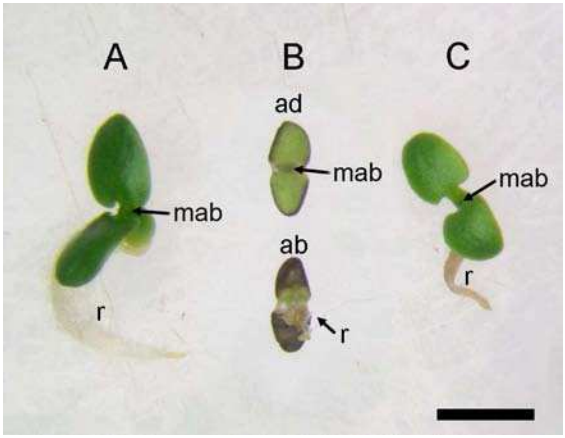


Fig. 3.III.4.- Plántulas de *Salix nigra* de siete días: **A**,Plántulas de semillas control. **B**, Plántulas de semillas expuestas durante tres días a 25 º C, 1300 lux. **C**, Plántulas expuestas durante tres días a 25 º C y oscuridad. **Abreviaturas**: **ab**, vista abaxial de los cotiledones; **ad**, vista adaxial de los cotiledones.; **r**, radícula; **mab**, meristema apical del brote. **Escala** = 2 mm

Respecto del daño causado por la fotooxidación a los tejidos un indicador del mismo es la variación en la composición de ácidos grasos. (Van Hasselt, 1974; De Kok y Kuiper, 1977). Dado que los ácidos grasos poliinsaturados son fácilmente oxidados, una mayor disminución de estos respecto de los mono- y de los no-saturados de la fracción lipídica provee una evidencia de la peroxidación de los mismos (Wilson y Mc Donald, 1986). Al respecto, los cambios más importantes detectados en las semillas de *S. nigra* expuestas tanto a 140 como a 1300 lux, correspondieron a los ácidos grasos poli-insaturados (Tabla 4). Esto concuerda con el hecho de que la fotooxidación produce una importante peroxidación lipídica en los tejidos (Foote, 1996). La pronunciada disminución de los ácidos grasos poli-insaturados (constituyentes de las membranas) que se detecta como consecuencia de la exposición a diferentes intensidades de luz supone importantes daños en las membranas, que serían reflejados en el decrecimiento de la GN. Un método sensible de detectar la peroxidación lipídica consiste en determinar la relación ácidos grasos poli-insaturados/(monoinsaturados + ácidos grasos saturados) (Priestley y Leopold, 1983). Cambios en la composición de ácidos grasos que acompañan la disminución de la GT se encuentran en Stewart y Bewley (1980), Pearce y Abdel Samad (1980), Powell y Matthews (1981). El gráfico de barras de la Fig. 3.III.5 que se elaboró utilizando esa relación, muestra que la intensidad de 140 lux fue suficiente para producir un muy alto decrecimiento de esa relación

de manera que una intensidad mayor sólo permitió una pequeña disminución adicional de la GN. De acuerdo a Leech y Murphy (1976) la marcada disminución en el contenido de los ácidos grasos poli-insaturados (Figura 13) podría ser explicado por la presencia de cloroplastos, cuyas membranas tilacoides son ricas en esos ácidos. Estas membranas constituyen un blanco potencial para la peroxidación debido a la contigüidad entre los ácidos poliinsaturados y la clorofila contenida en los complejos receptores de la luz (Halliwell y Gutteridge, 1999)**.** En este aspecto, las membranas tilacoides serían el primer blanco atacado por el oxígeno activado produciéndose una peroxidación que destruiría ácidos grasos y tilacoides, generando RL y EROs que propagarían el daño oxidativo a otros componentes, membranas y estructuras celulares, como se comprueba a continuación. Esta suposición recibió soporte de las imágenes obtenidas por TEM (Fig. 3.III.3), ya descriptas.

	Porcentaje de área de ácidos grasos					
	Palmítico	**Esteárico**	**Oleico**	**Linoleico**	**Linolénico**	**Otros**
	16:00	***18:00***	***18:1 w9***	***18:2 w6***	***18:3 w3***	***X:X***
Control	25.0 ± 3.5	4.6 ± 0.8	8.5 ± 0.7	41.7 ± 3.5	6.2 ± 1.4	12.9
140 lux	33.3 ± 5.6	5.0 ± 0.8	8,4 ± 1.6	15.7 ± 5.2	2.7 ± 2.4	24.8
1300 lux	30.4 ± 1.3	8.2 ± 1.7	11.2± 5.2	8.1 ± 1.3	2.4 ± 2.0	39.5

Tabla 3.III.1.- Porcentaje de área de ácidos grasos saturados e insaturados en semillas control y envejecidas en dos diferentes intensidades de luz, a 25 ° C durante tres días. Los valores corresponden a medias ± SD

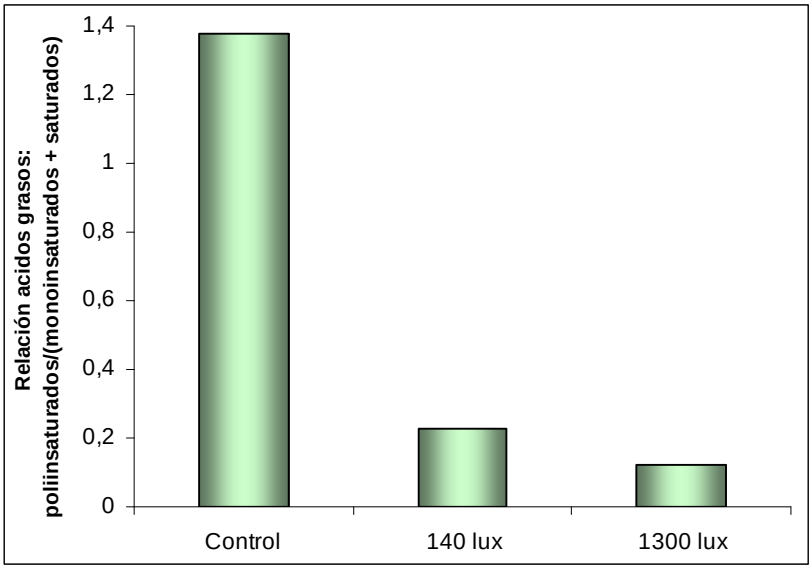


Figure 3-III.5.- Relación entre ácidos grasos poli-insaturados/ (ácidos grasos monoinsaturados + saturados) en semillas control y semillas envejecidas durante tres días a 25 º C y 140, y 1300 lux.

De acuerdo a Smith y Berjak (1995) la MET permite detectar los cambios que se producen en las membranas de los meristemas radiculares (como la separación de la membrana plasmática de la pared celular) al embeberse las semillas envejecidas. En este estudio se observó también la ocurrencia de una incipiente separación de la membrana plasmática de las paredes celulares, lo que en estado seco y debido al intenso proceso fotooxidativo podría significar daños en la misma (Fig. 3.III.3). Con el fin de evaluar la integridad de dicha membrana se determinó la permeabilidad por medio de ESR y pérdida de electrolitos. La Fig. 3.III.6 A representa los espectros de resonancia paramagnética de TEMPONE. Las señales del lado derecho del espectro muestran los componentes L y W que corresponden a las señales de las sondas que se encuentran en la fase hidrofílica e hidrofóbica del citoplasma, respectivamente. La relación W/L, que es un índice del daño de la membrana plasmática, decrece a 74% con 140 lux y no llega a 100% con una intensidad mucho mayor (1300 lux). Esta diferencia en la eficacia detrimental de la luz guarda correspondencia con los efectos sobre RL y GN antes mencionados, es decir, el aumento de la permeabilidad no guarda relación con la intensidad de luz. Los espectros de la figura 3.III-6 A muestran que el agente dispersante penetró la membrana plasmática dañada disipando la señal hidrofílica.

El decrecimiento de la relación W/L correlacionó cercanamente de forma lineal ($R^2 = 0.99$, $\alpha \leq 0.01$) con la pérdida de electrolitos resultando ambos métodos igualmente eficaces para medir la integridad de las membranas (Fig. 3.III.6 B). En semillas sometidas a procesos de secado, en cambio, Leprince y col. (1999) encontraron que la ESR es un indicador más sensible que la conductividad eléctrica para evaluar la integridad de las membranas. Estos resultados refuerzan la suposición ya mencionada de que el daño por RL originados en las membranas tilacoides se propaga a otras estructuras incluyendo la membrana plasmática.

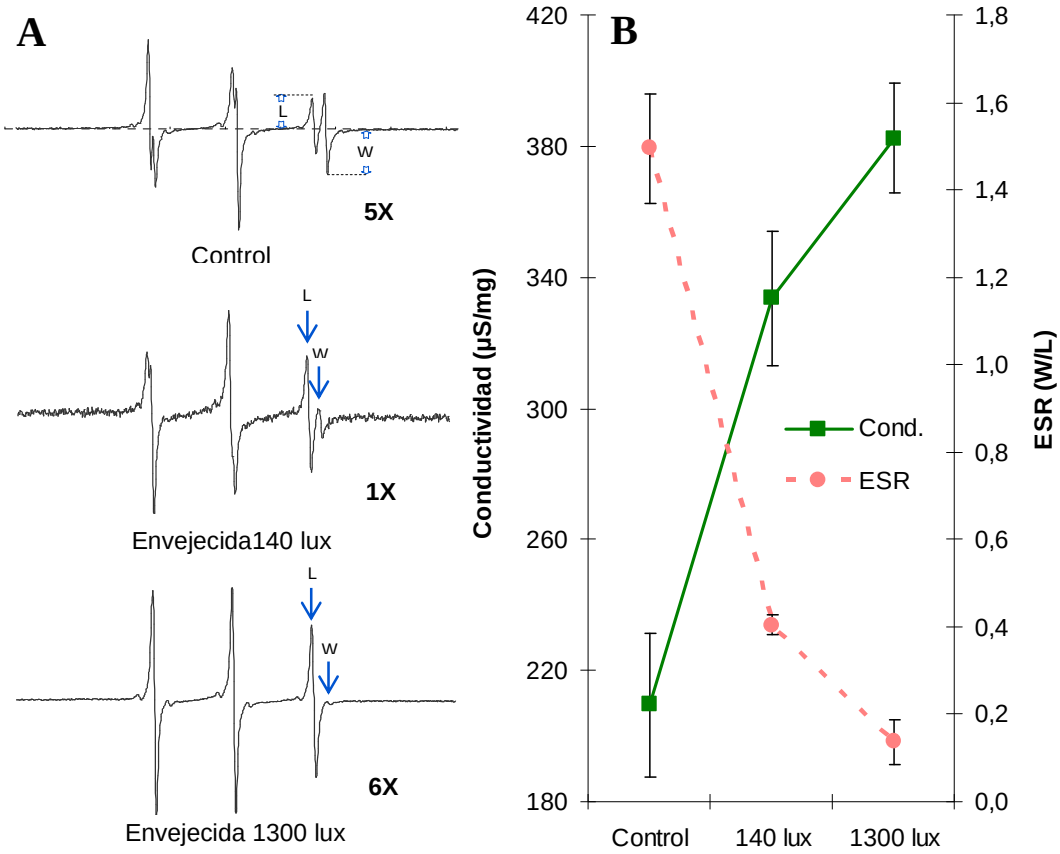


Figura 3.III.6.- ESR y conductividad como medidas de la permeabilidad de membrana en semillas envejecidas a 25º C por tres días. **A**, Espectros ESR de la sonda spin TEMPONE; **B**, - carta de comparación entre ESR (--●--) y conductividad (—■—). Valores corresponden a media ± DS.

Proteínas Oxidadas

Una gran variedad de proteínas esenciales para la fotosíntesis se encuentran insertas en las membranas tilacoides. Estas proteínas se hallan formando junto a la clorofila y otros pigmentos como los

carotenos los complejos receptores de la energía luminosa. Su contigüidad con la clorofila activada y con los ácidos grasos poli-insaturados de las membranas tilacoides indudablemente hacen de estas proteínas blanco de RL y ERO, tanto al inicio del proceso fotooxidativo (formación del oxígeno singulete) como durante la peroxidación de esos ácidos grasos. Otras proteínas componentes de dicha membrana, como las enzimas del transporte de electrones de la fotosíntesis y las que protegen dicho sistema del ataque oxidativo, serían también blancos de los agentes oxidantes como asimismo proteínas que atraviesan las membranas tilacoides, no ligadas a la fotosíntesis.

El envejecimiento de las semillas ha sido asociado con la acumulación de proteínas oxidadas. Las semillas de *S. nigra* envejecidas por la luz mostraron un apreciable aumento en la cantidad de proteínas oxidadas (Fig. 3.III.7).

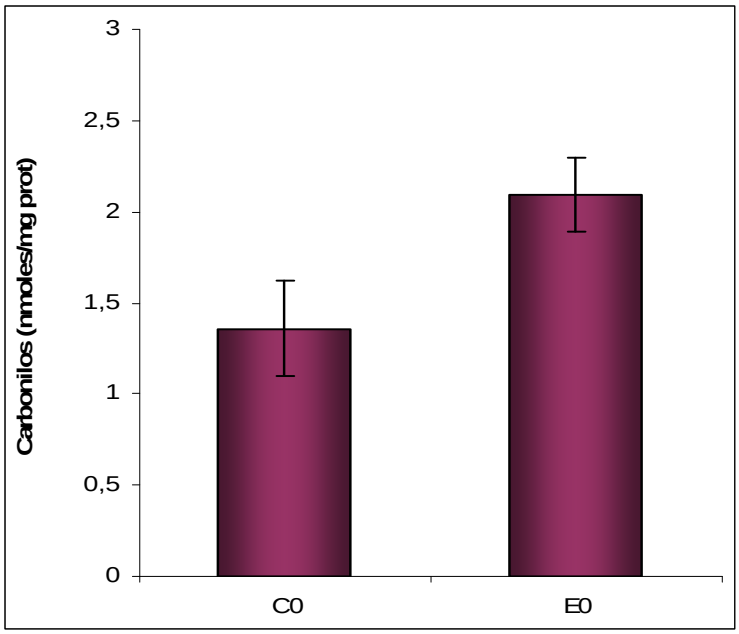


Fig. 3.III.7.- Efectos de la fotooxidación sobre el contenido de carbonilos en semillas envejecidas a 25º C por tres días

Pigmentos

Si bien en las semillas secas mantenidas en oscuridad se forma oxígeno singulete durante la peroxidación que acompaña al proceso de auto-oxidación, en condiciones de iluminación, el nivel de ese

agente se ve aumentado tanto por la transferencia al oxígeno de la energía de excitación de la clorofila activada por la luz, como el que se forma durante la intensa peroxidación lipídica que ocurre en esa condición. La clorofila tiene un rol dual ya que es generadora y blanco del oxígeno singulete (Knox y Dodge, 1985). Un papel importante de los carotenos que se encuentran en los llamados complejos fotosintéticos junto a la clorofila, es proteger este pigmento contra el ataque del oxígeno singulete (Halliwell, 1987; Brown y col., 1991). Los resultados de la figura 3.III.8 muestran que en la semilla seca, una intensidad luminosa baja es suficiente para producir una marcada disminución de los carotenos, hecho indicador de su rol protector aunque también se produce una disminución de clorofila a. El alto contenido de clorofila de estas semillas, al ser excitadas por la luz, seguramente promueve un nivel de oxígeno singulete que parece superar las defensas representadas por los carotenos y así afectar la clorofila.

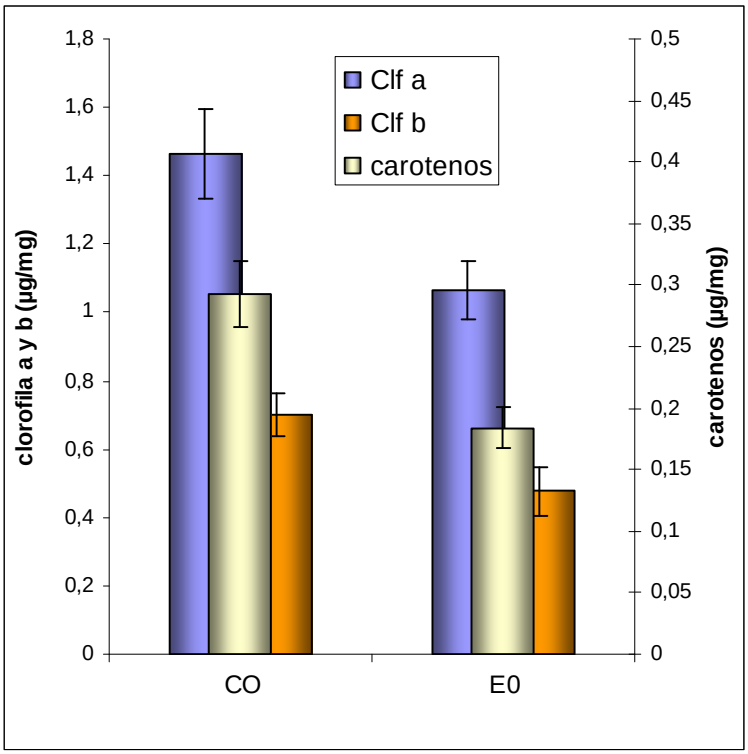


Fig. 3.III.8.- Efecto de la fotooxidación sobre el contenido de pigmentos

Como se vio hasta ahora los niveles de radicales libres estables detectados en estas semillas guardan relación con los daños producidos a diferentes componentes celulares. Esto contrasta con lo que acontece en el líquen *Tortula ruraliformis* (Seel y col. 1991), líquen tolerante a la desecación, y por ello comparable a la semilla de *Salix*. En el líquen, si bien se forman RL por fotoactivación de la clorofila, no se producen daños metabólicos. Se especula que podrían ocurrir reacciones radicalarias no dañinas que acumulan RL estables y/o existir en los tejidos deshidratados un elevado nivel de defensas moleculares como carotenos, α-tocoferol, glutation entre otros, que los anulan.

Respecto de si una intensa peroxidación lipídica como la que ocurre en estas semillas es compatible con la existencia de un estado de alta viscosidad que restringe el movimiento molecular, cabe mencionar que ese estado constituido por una matriz de movimiento restringido, contiene espacios libres abiertos por los que pueden difundir pequeñas moléculas como el oxígeno. Éste, activado por la clorofila excitada por la luz iniciaría el proceso de peroxidación, el que eventualmente se propagaría entre los ácidos grasos debida a la adyacencia que existe entre estos últimos en la membrana. Desde este punto de vista parecería no haber incompatibilidad entre intensa peroxidación lipídica y un estado de alta viscosidad. En cambio, la rápida propagación del daño a otros sistemas de membranas como membrana plasmática y de otras organelas, no sería explicable por adyacencia entre ácidos grasos y parecería difícil de conciliar con un estado de alta viscosidad. De todas maneras, si previo al inicio de estos procesos degradativos existió tal estado, es probable que una disminución de la viscosidad haya acompañado aquellos procesos.

En síntesis, los resultados de los tratamientos de luz mostraron que el incremento de la intensidad de la luz fue acompañado por la formación de RL, conduciendo a un decrecimiento de los ácidos poli-insaturados. Esto último fue asociado con importantes daños en las membranas tilacoides y con alteraciones en la estructura y permeabilidad de la membrana plasmática, todo lo cual conforma una secuencia de procesos fuertemente ligados que finalmente se reflejaron en el decrecimiento de la GN.

Reacción de Maillard

La reacción de Maillard consiste en una serie de reacciones que derivan de condensaciones no-enzimáticas entre una aldosa o cetosa con un grupo amino libre perteneciente a proteínas o ácidos nucleicos en las que se forma glucosamina. Ésta, por reordenamiento molecular forma productos de Amadori los que a su vez dan lugar a intermediarios con grupos carbonilo que por reacciones con otros grupos amino y por subsiguiente reordenamiento originan los llamados productos de Maillard. Los productos intermediarios de esta reacción compleja se caracterizan por su fluorescencia y con el tiempo llevan a la formación de pigmentos pardos y/o formación de entrecruzamiento entre proteínas, causando rigidez y pérdida de funcionalidad de las mismas (Graham, 1996). En el área de la ciencia de los alimentos los productos de esta reacción son considerados como un índice de pérdida de calidad. El aumento de la fluorescencia de las proteínas a 395/450 nm (excitación/emisión) es usado como una medida de la reacción de Maillard en numerosos estudios de viabilidad de semilla durante del almacenamiento, aunque los resultados son contradictorios (Sun y Leopold, 1995; Murthy y Sun, 2000; Murthy y col., 2002; Matiasevich y col., 2005). Al respecto, Wettlaufer y Leopold (1991) observan que en condiciones de envejecimiento acelerado, la germinación de las semillas de soja decrece en la medida que se acumulan productos de Maillard en el eje embrionario; esta correlación no se produce en condiciones de envejecimiento no acelerado. En cambio, Sun y Leopold (1995) sí encuentran que en los embriones de soja, los productos de Maillard se correlacionan con la pérdida de germinabilidad en condiciones de envejecimiento no acelerado. Por su parte, Castellion y col. (en preparación) encuentran en semillas de quinoa que la formación de productos de Maillard esta estrechamente correlacionada con la pérdida de germinabilidad.

Las semillas usadas en estas determinaciones que fueron mantenidas 3 años a -70° C muestran la presencia de productos de Maillard (Fig. 3.III.9a). Formación de productos de Maillard a temperaturas bajo cero fueron reportados por Schoebel y col. (1969) y Lim y Reid (1991).

Por otra parte, cuando las semillas control se mantuvieron a 25° C en oscuridad durante solo tres meses, el contenido de los productos de Maillard se incrementó aunque es importante señalar que las

semillas ya habían perdido la viabilidad dos meses antes. Independientemente de dicha pérdida, ese aumento producido en tres meses parece sugerir que el estado de la matriz citoplásmica permite una movilidad molecular relativamente alta.

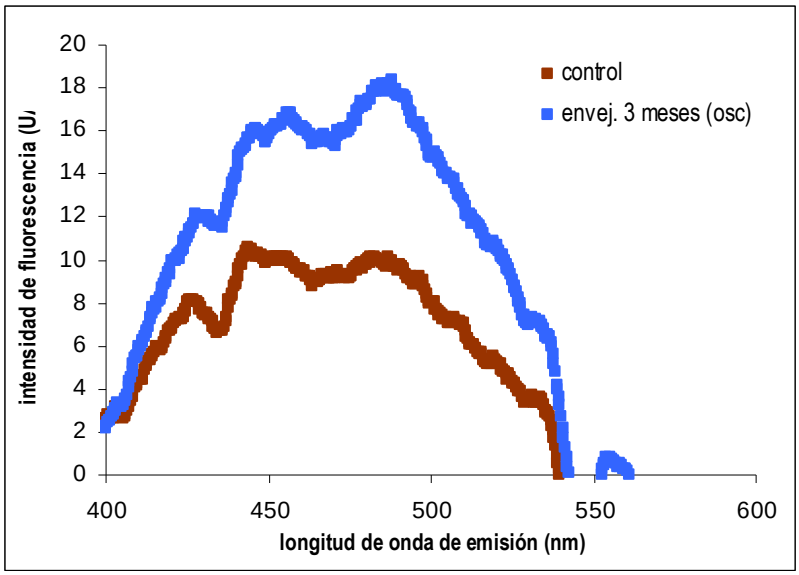


Fig. 3.III.9.a- Fluorescencia de los tratamientos indicados en el cuadro.

Las semillas mantenidas durante tres días a 25 ºC en oscuridad y a 1300 lux, no difirieron del control respecto del contenido de productos de Maillard. Si bien tres días resulta un lapso excesivamente breve como para que se manifieste dicha reacción amerita señalarse que en ese lapso se produjo un significativo aumento de carbonilos, uno de los precursores de los productos de Maillard (Fig.III.9.B).

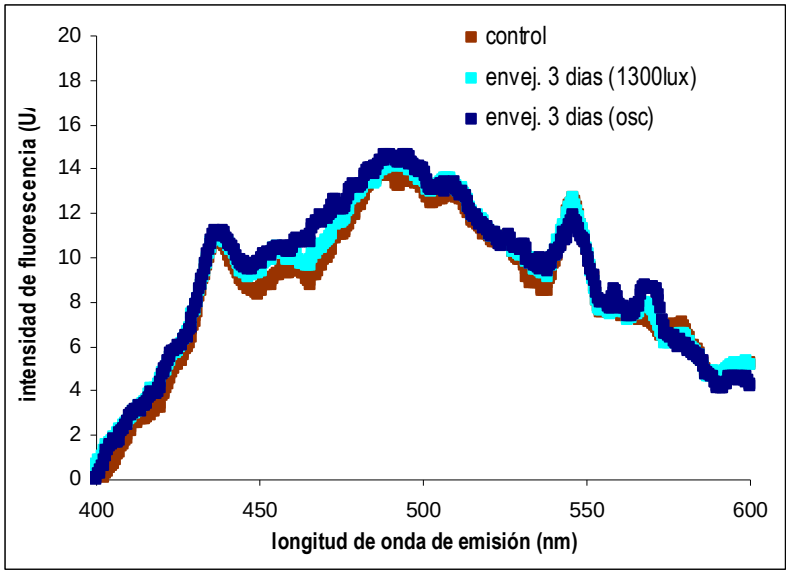


Fig. 3.III.9.b- Fluorescencia de los tratamientos indicados en el cuadro

La presencia de productos de Maillard en el control, lo mismo que la de los otros indicadores de daño evaluados en este capítulo no afectó sensiblemente la GN ya que esta fue cercana al 100% (Fig. 3-III-1.). Al respecto no se descarta que un control con menos contenidos de esos indicadores pudiera presentar igual porcentaje de GN pero un mayor vigor que estaría representado por un TMG menor a 1 día (Fig. 3-III-1.)

Autooxidación

En muchas semillas secas se han detectado muy bajos niveles de quimioluminiscencia que se producen durante el lento proceso de peroxidación lipídica (Boveris y col., 1980). Esto refleja el nivel de radicales libres reactivos y oxígeno singulete que se producen en ese proceso y que pueden generar una serie de reacciones radicalarias que concluyen en la formación de los radicales libres estables. (Hendry, 1993; Szöcs, 2002, Smirnoff, 1993). La detección de estos agentes de daño metabólicos es una prueba de la ocurrencia del proceso de autooxidación u oxidación espontánea.

Respecto del proceso de autooxidación que puede ocurrir en estas semillas, la evaluación del mismo requiere que las semillas se mantengan en oscuridad a fin de evitar la interferencia de la fotooxidación. El

experimento graficado en la figura 3.III.1 muestra que el tratamiento C, que se hizo en oscuridad, produjo en sólo tres días a 25 ° C una significativa disminución de la GN que se atribuyó a autooxidación y a reacciones del oxígeno con radicales libres pre-existentes en las semillas control. Ese proceso no fue acompañado por un aumento de radicales libres estables respecto del que mostró el control; al respecto no se descarta que durante los tres días de duración del experimento no se hubiera producido aún un significativo incremento de los radicales libres estable, ya que, como se indicó precedentemente derivan de reacciones radicalarias que en estado seco son lentas. Estos resultados son consistentes con los correspondientes a los realizados también en oscuridad que ilustra la figura 3.III.10 A. En la misma se aprecia el curso que sigue el descenso de la GN y la GT durante un lapso suficientemente prolongado como para que decaigan ambas germinaciones (GN y GT) y no sólo de tres días como en el experimento ilustrado en la figura 9. La figura 3.III.10 B muestra la presencia de malondialdehído (MDA) tanto en el control como asimismo el que se fue generando a lo largo del descenso de ambas germinaciones. MDA es uno de los productos que derivan de la reacción espontánea entre el oxígeno y los ácidos grasos insaturados (autooxidación) en la que se producen una serie de radicales libres reactivos y otros compuestos entre los que se encuentra aquella molécula. Su presencia, determinada mediante el ácido tiobarbitúrico, se usa como indicador de la ocurrencia de procesos de autooxidación y de la presencia de radicales libres. MDA se forma por la peroxidación de ácidos grasos con tres o más dobles enlaces y, de los ácidos insaturados detectados en estas semillas, sólo el linoleico, que se encuentra en muy baja proporción, cumple esta exigencia quedando la peroxidación de los otros sin ser detectada. En consecuencia, el MDA resulta un indicador que subestima la cuantía de ese proceso.

Otra conclusión que deriva de la figura 3.III.10 es que el descenso de la GT en oscuridad (autooxidación) es prácticamente el mismo que ocurre a 140 lux, lo que indica que el intenso proceso fotooxidativo con el daño metabólico asociado que se produce en los tejidos superficiales de la semilla, no alcanza a afectar al meristema apical del brote a esa intensidad de luz, lo cual reduce la relevancia que en un principio se le adjudicó al proceso fotooxidativo y a la presencia de clorofila como causantes del rápido deterioro. En cambio estaría fuertemente asociado con la autooxidación y no con la fotooxidación. Sin

embargo, no se descarta que la fotooxidación inducida por la luz tenga algún grado de incidencia, indudablemente menor en la pérdida de viabilidad, según se concluye cuando se comparan el descenso de la GT a la luz y en oscuridad. En esas circunstancias se observa que la anulación de la GT a la luz antecede aunque en unos pocos días al que ocurre en la oscuridad.

Por otra parte, otra de las reacciones además de la autooxidación que se considera causa de envejecimiento en las semillas secas es la formación de los productos de Maillard. Como se vio cuando se trató esta reacción, el contenido de estos productos en las semillas control no afectó la GN dado que ésta fue de casi 100%. Por otra parte, la figura 3.III.10 muestra que las semillas mueren en alrededor de un mes cuando el contenido de Maillard aumentó sólo una tercera parte del nivel alcanzado a los tres meses, no llegando éste a duplicar el de la semilla control. Estos resultados parecen entonces señalar a la autooxidación como causa principal del deterioro, aunque cabe preguntarse entonces porque este proceso es mucho más intenso en estas semillas que en otras que también toleran la deshidratación.

Los resultados hasta aquí obtenidos rechazan, en consecuencia la hipótesis originalmente formulada acerca de que la clorofila tendría un rol significativo en la rápida perdía de la viabilidad.

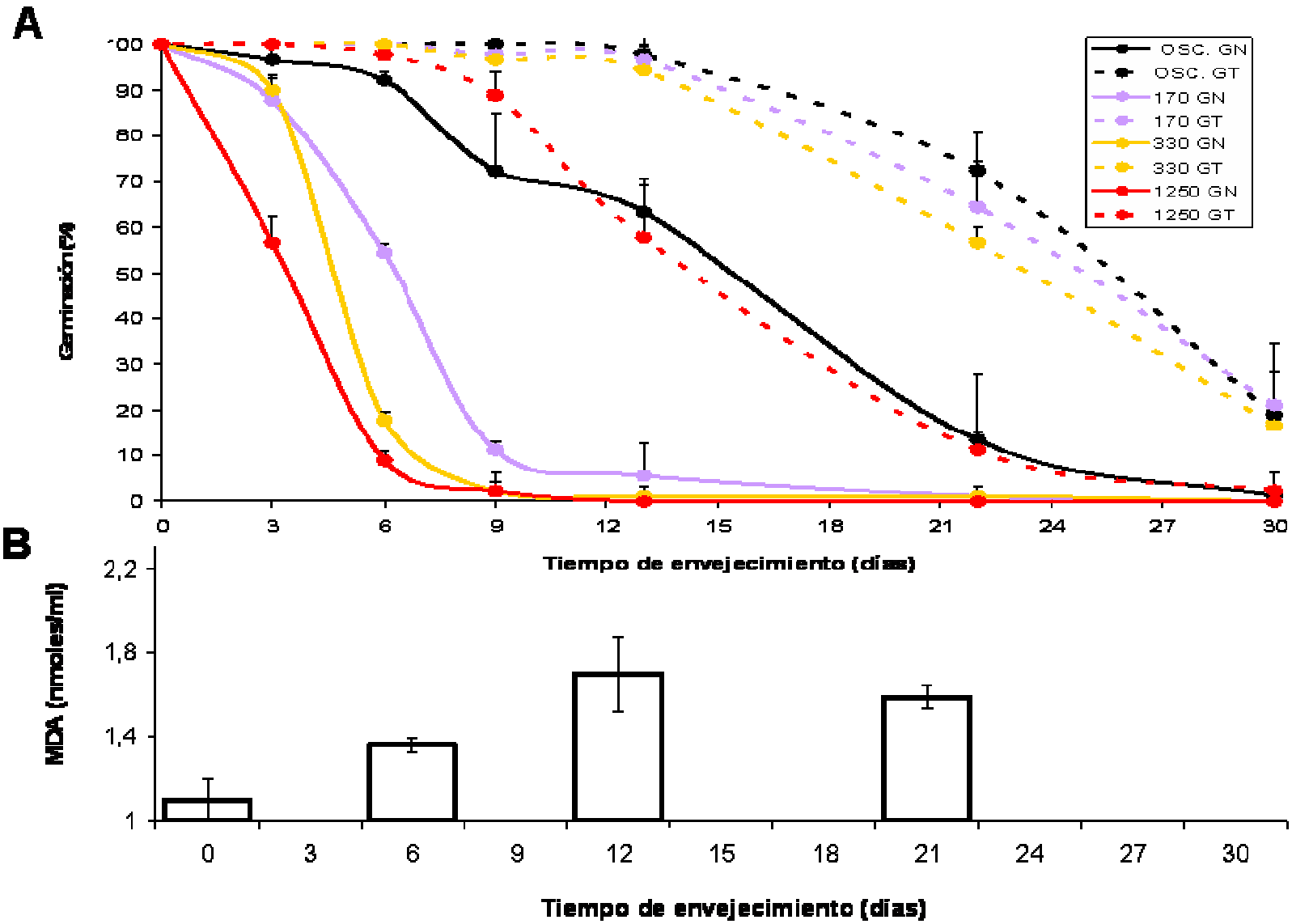


Figura 3.III.10 **A -** Curso de la GN y GT de semillas de sauce durante el envejecimiento en oscuridad y a tres intensidades de luz (170, 330 y 1250 lux).

B - Contenido de MDA en semillas de sauce envejecidas en oscuridad durante diferentes tiempos.

Cuadro 3.III.1.- Radicales libres y Especies reactivas del Oxígeno

Los **radicales libres** son especies moleculares que contienen un electrón desapareado (representado generalmente como $R^{\cdot}$), lo que los vuelve una de las de las moléculas químicamente mas reactivas. Un radical libre tiene la capacidad de sustraer un segundo electrón de una molécula vecina debido a la necesidad de aparear su electrón libre. Esto causa la formación de otro radical libre generando una autopropagación en cadena de reacciones sucesivas.

Se denomina colectivamente **Especies Reactivas del Oxígeno** (**ERO**) tanto a los radicales libres que contienen oxígeno -como el anión superóxido ($O_2^{\cdot}$), el radical peróxido ($LOO^{\cdot}$), el radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$)- como a los compuestos no radicalarios y muy reactivos que lo contienen, por ej. peróxido de Hidrógeno (H_2O_2).

Existen sustancias antioxidantes (enzimáticas y no enzimáticas) encargadas de "neutralizar" a los radicales libres por la sustracción del electrón desapareado.

Los **antioxidantes** son un conjunto heterogéneo de sustancias formado por vitaminas, minerales, pigmentos naturales, enzimas y otros compuestos, que bloquean el efecto nocivo de los radicales libres.

Cuando el aumento del contenido intracelular de EROs sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el **estrés oxidativo**, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. Los radicales libres son especies moleculares que contienen un electrón desapareado (representado generalmente como $R^{\cdot}$), lo que los vuelve una de las de las moléculas químicamente mas reactivas. Un radical libre tiene la capacidad de sustraer un segundo electrón de una molécula vecina debido a la necesidad de aparear su electrón libre. Esto causa la formación de otro radical libre generando una autopropagación en cadena de reacciones sucesivas.

Se denomina colectivamente **Especies Reactivas del Oxígeno** (**ERO**) tanto a los radicales libres que contienen oxígeno -como el anión superóxido ($O_2^{\cdot}$), el radical peróxido ($LOO^{\cdot}$), el radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$)- como a los compuestos no radicalarios y muy reactivos que lo contienen, por ej. peróxido de Hidrógeno (H_2O_2).

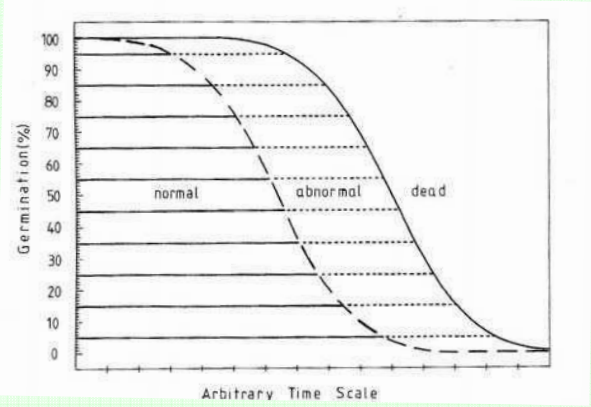
Existen sustancias antioxidantes (enzimáticas y no enzimáticas) encargadas de "neutralizar" a los radicales libres por la sustracción del electrón desapareado.

Los **antioxidantes** son un conjunto heterogéneo de sustancias formado por vitaminas, minerales, pigmentos naturales, enzimas y otros compuestos, que bloquean el efecto nocivo de los radicales libres.

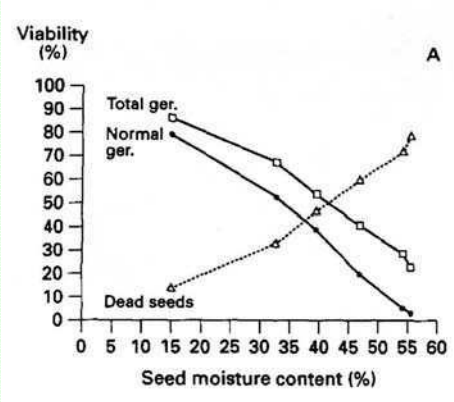
Cuando el aumento del contenido intracelular de EROs sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el **estrés oxidativo**, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.

Cuadro 3.III.2.- Tres ejemplos tomados de la bibliografía que muestran que GN y GT ocurren casi simultáneamente.

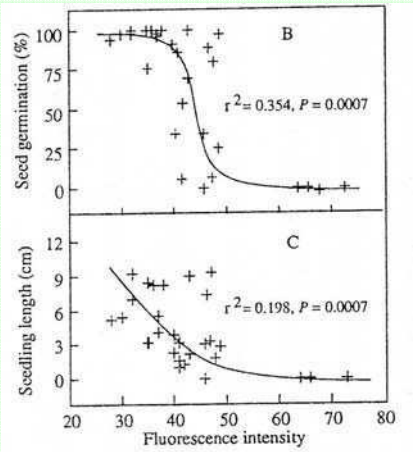
Semillas ortodoxas (Ellis y Roberts, 1981)



Semillas de soja (Sun and Leopold, 1995)



Semillas de arveja (Sivritepe y Dourado, 1995)



CAPITULO 3-IV

REVERSION DEL DETERIORO DURANTE LA IMBIBICIÓN DE LAS SEMILLAS ENVEJECIDAS

INTRODUCCIÓN

En el capítulo 3-1 se vio que cuando las semillas de *S. alba* y *S. matsudana* se sometían a humidificación y se testeaba la germinación, a medida que aumentaba el contenido de agua, ocurría inicialmente un descenso de la germinación normal (GN) que era seguido por un ascenso de la misma, comportamiento que es difícil de explicar, suponiendo que el efecto de la humidificación sea evitar un daño por imbibición.

Por otra parte, en las semillas secas se determinó que el rápido descenso de la GN que ocurre por exposición a la luz, estaba asociado a un intenso proceso de peroxidación lipídica, formación de RL e importantes daños a componentes celulares. El más lento descenso que ocurre en oscuridad, también estaba asociado a un proceso peroxidativo aunque producido espontáneamente.

Cabe señalar que cuando las semillas de sauce se sometieron a humidificación alcanzaron un 33% de contenido de agua en relativamente poco tiempo (capitulo 3-I), porcentaje que se incrementó sólo ligeramente durante las 18 horas posteriores al comienzo de la humidificación, sin que se produjera el inicio de la germinación propiamente dicha (extensión del hipocótilo). En cambio, colocadas sobre papel mojado la germinación se iniciaba en menor tiempo. Esta demora en el inicio de la germinación cuando se humedece, hace comparable la humidificación a la hidratación parcial a la que se someten las semillas (priming) (Chojnowski y col., 1997; Taylor y col., 1998), especialmente las envejecidas, a fin de aumentar la velocidad de germinación y de reducir la amplitud del periodo de germinación lo cual permite obtener lotes de plántulas uniformes en menor tiempo. El fundamento de este método se basa en que durante la imbibición de una semilla ortodoxa, y hasta tanto no se alcance el valor de contenido de agua que permite la división y la

elongación celular (inicio de la plántula), operan procesos pregerminativos de rediferenciación de la estructura celular y de reparación de los daños a componentes celulares que pudieron ocurrir por una parte, durante la deshidratación que acompaña la última etapa del desarrollo de la semilla y por otra, de los daños propios del envejecimiento. Evitar que se alcance ese valor de contenido de agua que permite el inicio de la germinación equivale, entonces, a prolongar el lapso en que actúan esos mecanismos y así mejorar la calidad fisiológica de la semilla (Taylor y col., 1998; Chojnowski y col., 1997). Un método usado para controlar el nivel de hidratación es mantener las semillas embebidas en una solución de un agente osmótico (osmopriming). La figura Fig. 3.IV.1 muestra como la GN de semillas de sauce removidas a tiempos crecientes de una solución de PEG 6000 al 33%, muestra una fluctuación de la GN similar a la que ocurre por humidificación, confirmando así la similitud entre humidificación y *priming* (Cap 3-I).

Por lo hasta aquí considerado es presumible que la mencionada recuperación de la GN esté acompañada por una progresiva disminución del daño celular (producidos por RL y por el proceso de peroxidación lipídica, como antes mencionado) mientras que el inicial descenso de ese parámetro germinativo lo sea, en cambio, por una acentuación del daño oxidativo, aspectos que se investigan en este capítulo.

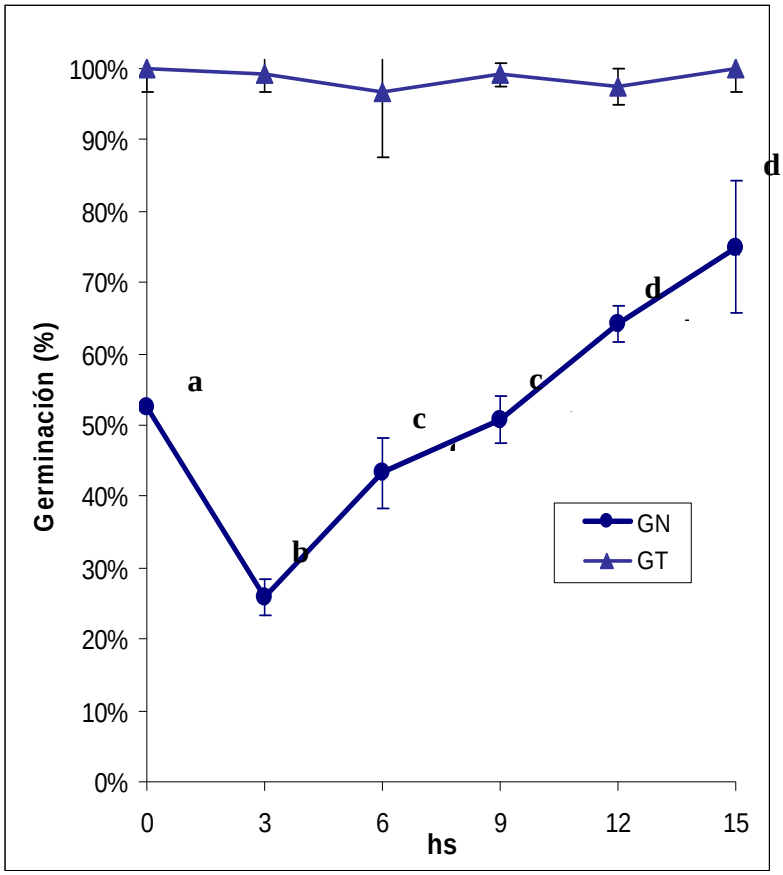


Fig. 3.IV.1.-G y GN en función del tiempo de hidratación en solución de PEG 6000 al 33%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semillas control usadas en este capítulo fueron envejecidas en las mismas condiciones que las usadas en el Cáp. 3-III (140 lux durante 3 días y 25º C)

Autooxidación

Las semillas sometidas a humidificación muestran al inicio de este proceso un aumento de la luminiscencia. Ese aumento inicial y transitorio es, según Boveris et al. (1984), uno de los primeros eventos bioquímicos de la germinación. Dicho autor considera que ello es debido a que aumenta la actividad oxidativa como consecuencia de que: (i) los radicales peroxilos ($ROO^{\cdot}$) producidos en el lento proceso de autooxidación colisionan con las moléculas blanco por la mayor movilidad debido a la hidratación; (ii) los hidroperóxidos experimentan rupturas homolíticas ($ROOH \rightarrow RO^{\cdot}\ HO^{\cdot}$); y (iii) se forma oxígeno singulete. Todos estos procesos elevan el nivel de luminiscencia (golpe oxidativo). En el caso de la semilla de sauce, a las tres horas de humidificación, momento en el que es máximo el descenso de la GN, se detectó un aumento de la luminiscencia. En los numerosos trabajos en los que se aplica el *priming* a fin de mejorar su comportamiento germinativo, no se menciona que al inicio de la imbibición se haya detectado un descenso de la GN o de otro indicador del comportamiento germinativo (Bradford, 1986; Liu y col., 1996; Usberti & Valio, 1997). Tampoco se hace esa mención en los trabajos sobre hidratación en atmósfera saturada (humidificación) (Pollock, 1969; Ellis y col., 1990; Bewley y Black, 1994).

. En este sentido los resultados aquí obtenidos son los primeros en reflejar en un parámetro visible como es la GN, la ocurrencia de este golpe oxidativo que se produce al inicio de la hidratación. Este hecho parece consistente con el nivel relativamente alto de actividad oxidativa que tienen estas semillas y que determina su corta longevidad. Por esa razón, el golpe oxidativo que se produce al comienzo de la hidratación sería importante y además, estaría potenciado porque el contenido de agua en ese momento resultaría insuficiente para que actuaran los mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante y de reparación. Además, la rápida germinación que tienen estas semillas, probablemente debido al estar ya parcialmente

desdiferenciadas, no permite completar la reparación metabólica. La convergencia de estos dos hechos, fuerte golpe oxidativo y desdiferenciación parcial, determinaría que cuando las semillas al comienzo de la humidificación son puestas a germinar muestren un descenso de la GN simultáneo con el incremento de la luminiscencia. A media que aumenta el tiempo de humidificación se produce una disminución de la luminiscencia que resultaría concordante con el incremento en el accionar de esos mecanismos (Fig. 3.IV.2)

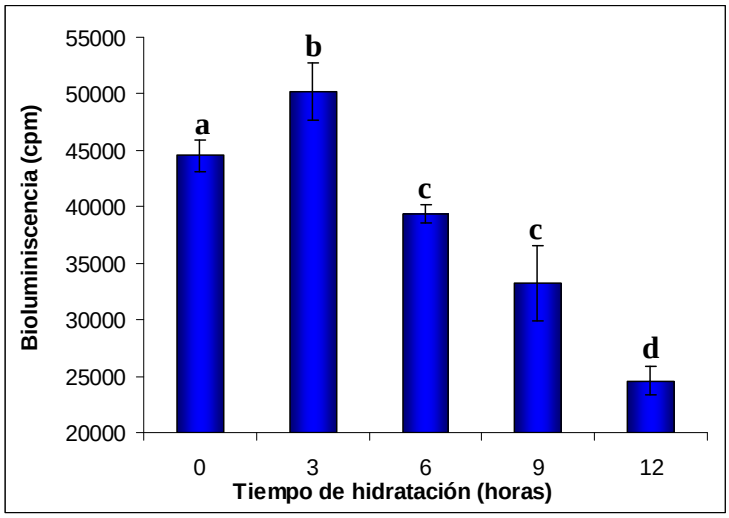


Fig. 3.IV.2.- Quimioluminiscencia de semillas sometidas a diferentes tiempos de hidratación. Los tratamientos con la misma letra minúscula encima de las columnas no son significativamente diferentes con un P= 0,005 por el test de Tukey.

Radicales libres (RL) estables

Las semillas sometidas a humidificación mostraron, con el aumento del tiempo de humidificación una progresiva disminución de los RL estables, sin que se produjera al principio un incremento de esos agentes que pudiera asociarse con el descenso de la GN tal como ocurre con la quimioluminiscencia y otros parámetros de daño que se describen en este capítulo.

Al respecto, no se descarta que el momento en que se efectuó la primera medición (3 h) haya sido inadecuado para detectar un incremento en la cantidad de radicales libres estables. Por otra parte, el

momento que se detecta la mayor formación de RL libres activos (asociados a la generación de luminiscencia; 3h de humidificación) sería prácticamente el mismo en que se detectan los estables sólo en el caso en que la velocidad de las reacciones que los originan a partir de radicales reactivos fuese muy alta. Por otra parte, si se hubiese producido un aumento después de las 3 h no se descarta que tampoco se los detectara porque con el aumento de tiempo de humidificación se incrementaría la actividad de los sistemas enzimáticos que los eliminan, lo que explicaría el paulatino descenso de esos radicales (Fig. 3.IV.3)

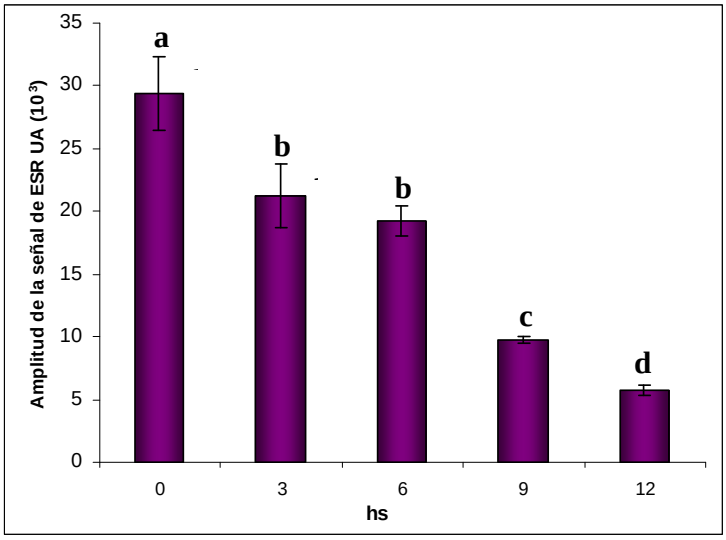
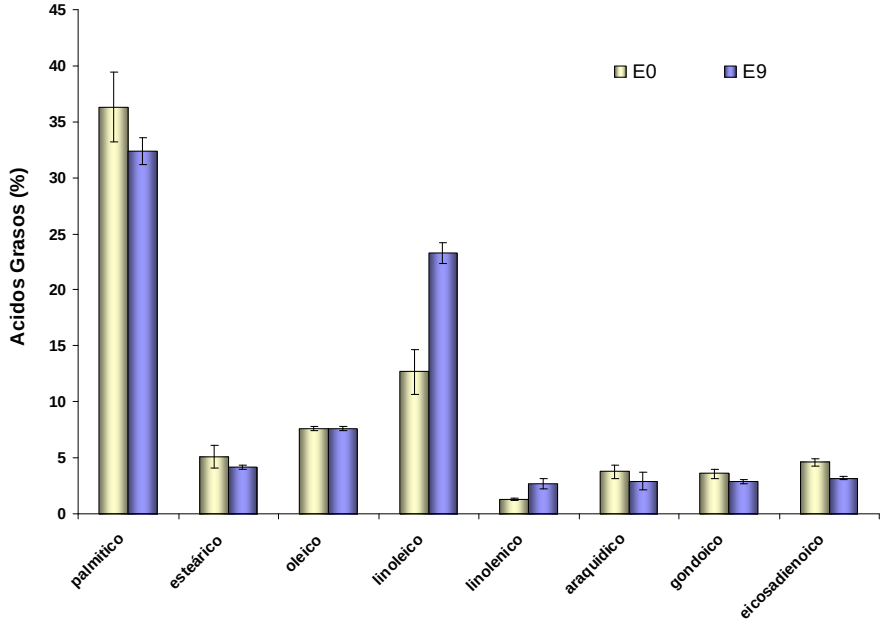


Fig. 3.IV.3.- Radicales libres estables medidos por EPR en semillas sometidas a diferentes tiempos de hidratación. Los tratamientos con la misma letra minúscula encima de las columnas no son significativamente diferentes con un P= 0,005 por el test de Tukey.

Perfil del ácidos grasos

Un sensible indicador de la disminución del proceso de peroxidación lipídica por efecto de la hidratación está dado por los cambios en el perfil de los ácidos grasos. La figura 3.IV.4 muestra los contenidos de ácidos grasos extraídos de semillas después de 9 horas de humidificación (E_9). Se observa una marcada recuperación de los ácidos poliinsaturados (linolénico y linoleico) que superan ampliamente a los niveles correspondientes a los de los de las semillas control, indicando una reversión del proceso de peroxidación.



.

Fig. 3.IV.4.- Perfil de ácidos grasos de semillas control (E_0) y a las 9 horas de hidratación (E_9).

Proteínas Oxidadas

Las semillas sometidas a humidificación mostraron, coincidentemente a lo sucedido con los otros parámetros de daño evaluados, un aumento de proteínas oxidadas al inicio de la imbibición (Fig. 3.IV.5). Sin embargo, a diferencia de esos mismos parámetros, con el aumento del tiempo de humidificación sólo se registró una ligera disminución de proteínas oxidadas. Este bajo descenso podría deberse a que esas proteínas resultaron oxidadas por productos de la peroxidación lipídica, porque en ese caso no sólo serían resistentes a la proteólisis sino que también pueden inhibir la capacidad de las proteasas para degradarlas (Rivet, 1986; Friguet y col., 1994). Esa sería la razón por la que las proteínas oxidadas disminuyeran sólo ligeramente.

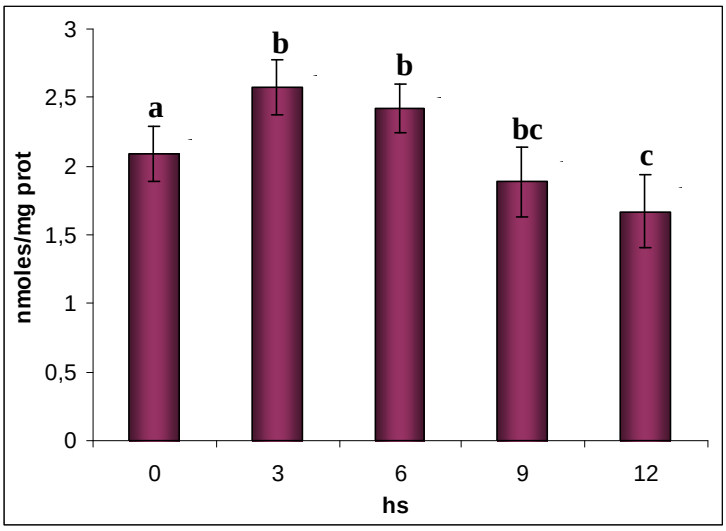


Fig. 3.IV.5.- Contenido de carbonilos de proteínas soluble en semillas sometidas a diferentes tiempos de hidratación (hs). Los tratamientos con la misma letra minúscula encima de las columnas no son significativamente diferentes con un P= 0,005 por el test de Tukey

Pigmentos

Las semillas sometidas a humidificación mostraron al principio de la misma una sensible reducción en el contenido de clorofila a y carotenos sin que se produjeran cambios apreciables en el contenido de clorofila b (Fig. 3.IV.6). En el líquen *Dicranella palustris* durante la desecación también se produce una selectiva y severa destrucción de clorofila a resultando la clorofila b menos afectada. (Seel y col., 1991)

Asimismo el contenido de carotenos mostró una fuerte reducción. Con el aumento del tiempo de humidificación tanto el contenido del clorofila a como el contenido de los carotenos aumentaron sensiblemente. (Fig. 3.IV.6).

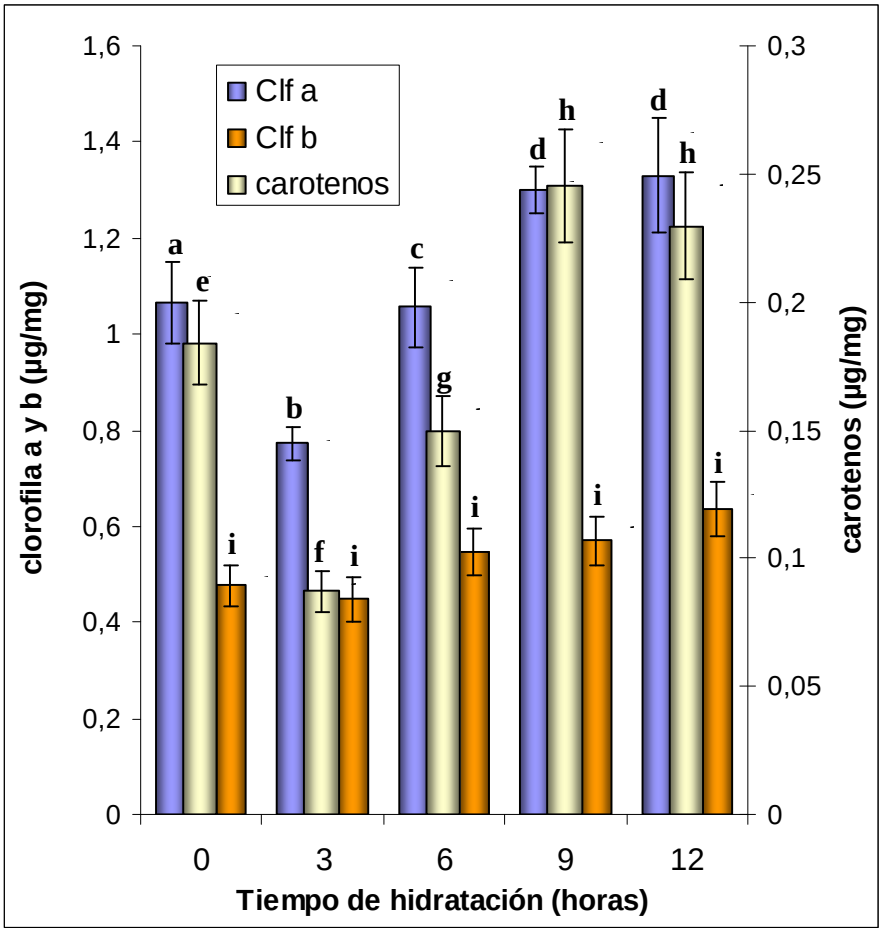


Fig. 3.IV.6.- Contenido de pigmentos (ver cuadro inserto) en semillas sometidas a diferentes tiempos de hidratación (hs). Los tratamientos con la misma letra minúscula encima de las columnas no son significativamente diferentes con un P= 0,005 por el test de Tukey. Los valores de clorofila b no presentan diferencias significativas entre los tratamientos

Integridad de la membrana plasmática

En el capítulo 3.III se evaluó por medio de ESR y por pérdida de electrolitos, el estado de las membranas plasmática en las semillas envejecidas por la luz y se comprobó que valores bajos de la intensidad lumínica eran suficiente para producir un importante daño a la membrana. Ello se reflejaba en un aumento de su permeabilidad (valores bajos de W/L y altos de pérdida de viabilidad). Cuando las semillas envejecidas se sometieron a hidratación se observó una gradual recuperación de la permeabilidad evaluada por el cociente W/L, lo que implica una clara muestra del importante rol que en estas semillas cumplen los mecanismos de reparación. No se evaluó, como en el caso de la semilla seca, la pérdida de electrolitos

debido a que durante la hidratación ya se produce este proceso. Resultados del mismo capítulo sugieren que el mayor daño oxidativo en las semillas que reciben luz se produciría en las tilacoides propagándose a otros componentes celulares como las membranas plasmáticas. En consecuencia, es esperable que en los cloroplastos, el nivel de radicales libres activos sea mayor que en el resto del citoplasma y en consecuencia, también lo sea el golpe oxidativo. En el resto del citoplasma, el menor nivel de radicales libres determinaría que el incremento que se produce al comienzo de la hidratación (3 h) no alcance a promover un daño que aumente la permeabilidad respecto de la que muestra el control como se aprecia en la figura 3.IV.7.

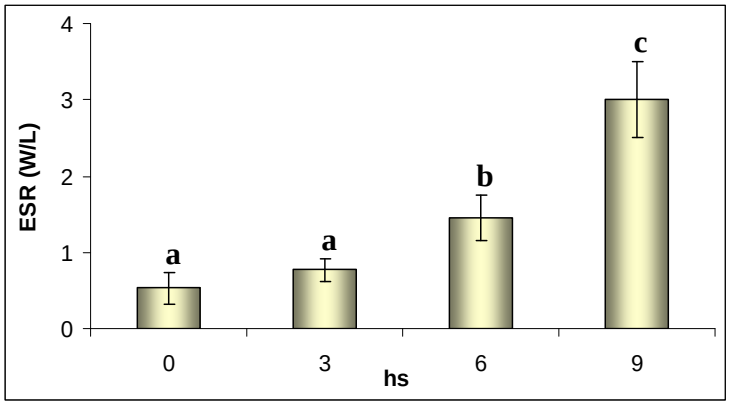


Fig. 3.IV.7.- ESR como medida de permeabilidad de membrana en semillas envejecidas sometidas a diferentes tiempos de humidificación (hs). Los tratamientos con la misma letra minúscula encima de las columnas no son significativamente diferentes con un $P \leq 0,05$ por el test de Tukey

Reacción de Maillard

Las semillas sometidas a humidificación mostraron un marcado descenso en el contenido de Maillard (Fig. 3.IV.8). Si bien en la bibliografía no existen referencias de un hecho similar cabe suponer que entre los mecanismos de reparación que comienzan a actuar al hidratarse la semilla, se encontrarían los que dan cuenta de ese descenso, sin que se pueda descartar *a priori* la existencia de alguno específico para la eliminación de esos productos.

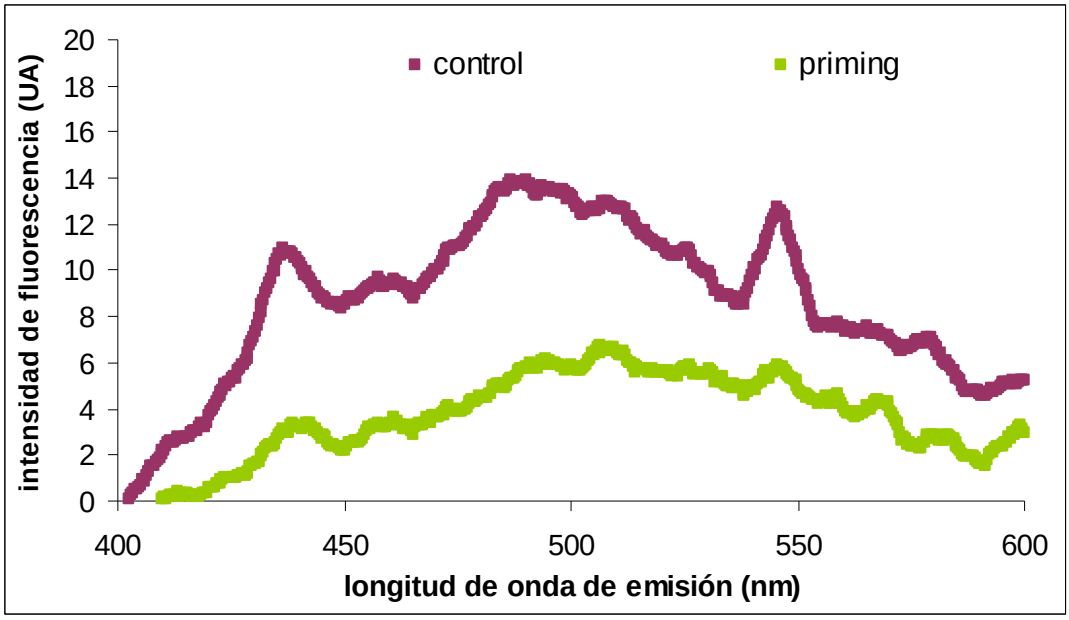


Fig. 3.IV.8.- Fluorescencia de semillas antes y después de la humidificación.

Los resultados obtenidos en este capítulo concuerdan con la suposición expresada en Introducción (de este mismo capítulo) acerca de que la fluctuación de la GN durante la humidificación es debida a una similar fluctuación en el nivel de daño oxidativo.

CAPÍTULO 3.V

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL CONTENIDO CELULAR

En este capítulo se tratan separadamente tres aspectos que tienen que ver con las características físicas del contenido celular de los tejidos embrionarios. Ellos son.

(a). TRANSICIONES VÍTREAS (página 88)

(b). MOVILIDAD MOLECULAR (página 95)

(c). ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA Y NITROGENO (página 100)

(a). TRANSICIONES VÍTREAS

INTRODUCCIÓN

La capacidad de algunas semillas para mantenerse viables por largos períodos con muy bajos contenidos de agua y en algunos casos soportar contenidos tan bajos como cercanos al 1%, sugirió a los investigadores que el mecanismo de tolerancia debe producir protección a todos los componentes celulares. Un tipo de protección del citoplasma es el obtenido por la vitrificación del mismo. En sistemas biológicos deshidratados, gran parte de los componentes se encuentran en estado amorfo formando vidrios (Levine & Slade 1990; Ross & Karel 1991). Los componentes celulares no pueden alcanzar configuraciones de equilibrio y por lo tanto no pueden organizarse para formar un cristal, sino que permanecen en forma desordenada o amorfa.

En el estado vítreo, por lo tanto, un fluido llega a ser altamente viscoso hasta tener propiedades mecánicas similares a la de un sólido. Los sólidos amorfos son materiales meta-estables con alta viscosidad y baja movilidad molecular, existen en un estado de no-equilibrio y exhiben cambios dependientes del tiempo a medida que se acercan al equilibrio. El aspecto de un material vítreo es el de un sólido rígido quebradizo caracterizado por una altísima viscosidad (alrededor de 10^{12} a 10^{14} Pa s) (Sperling, 1986).

La movilidad molecular en los vidrios está restringida a vibraciones y movimientos rotacionales de rango corto. Los cambios que ocurren en el estado vítreo, generalmente llamados “envejecimiento físico”, son extremadamente lentos, y por lo tanto, los sistemas se pueden considerar estables a cambios físicos y químicos. Un material amorfo vítreo puede pasar al estado líquido sobreenfriado dependiendo de la temperatura y de la presencia de agua. El cambio entre los estados vítreos y sobreenfriados se conoce como transición vítrea y corresponde a una temperatura a la cual los vidrios empiezan a ablandarse y fluir (Sperling, 1986). Por debajo de la temperatura de transición vítrea (T_g), que es característica de cada sistema, el material es un sólido amorfo (vidrio). Las propiedades típicas de la mayor parte de los materiales vítreos (llamados frágiles) son la fragilidad y la transparencia. La transformación de materiales vítreos en líquidos

superenfriados viscosos ocurre en el rango de la temperatura de transición vítrea. Es importante notar, que sobre el rango de la T_g, un cambio de pocos grados de temperatura puede provocar en los materiales frágiles, una disminución significativa en la rigidez. Debido a que las moléculas en los materiales en estado sobreenfriado tienen mayor movilidad que en el vidrio, son más susceptibles a que en ellos ocurran cambios físicos o químicos. En este sentido la T_g es considerada como un "punto crítico" o una "barrera" para los cambios en lo que respecta a ciertos aspectos de la estabilidad de sistemas amorfos.

Burke (1986) considera que el estado vítreo es el mayor componente de la estabilización de semillas secas en almacenaje. Los trabajos realizados por Williams (1994), Leopold y col. (1994) confirman las sugerencias de Burke y desarrollan evidencias de la contribución del estado vítreo en la fisiología de las semillas. El estado vítreo es uno de los principales factores de la estabilidad y calidad de semillas secas al suprimir reacciones químicas, previniendo así daños a macromoléculas y metabolitos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los termogramas obtenidos por DSC para semillas de *Salix nigra* equilibradas a actividades de agua de 0.11 y 0.75 se muestran en la figura 3.V.1 (A-B). Se observan transiciones térmicas que fueron independientes del contenido acuoso, con un pico en el rango de 0° C, atribuidos a los lípidos de la semilla. En estudios previos realizados en semillas de quinoa (Matiacevich y col. 2007), embriones de maíz (Williams & Leopold 1989), semillas de *Cuphea* (Crane y col. 2003) se observaron transiciones importantes a menores temperaturas, en el rango de–80 a -10º C que se atribuyeron principalmente a la fusión de las distintas fracciones de lípidos. En el caso de sauce, la fusión se presenta a temperaturas cercanas a 0° C y el área de los picos es más grande (5.5 J/g), comparado con el de otras semillas indicando un alto contenido lipídico de un punto de fusión relativamente elevado. Las temperaturas de transición vítrea se muestran también indicada en las figuras 3.V.2 (A-D).

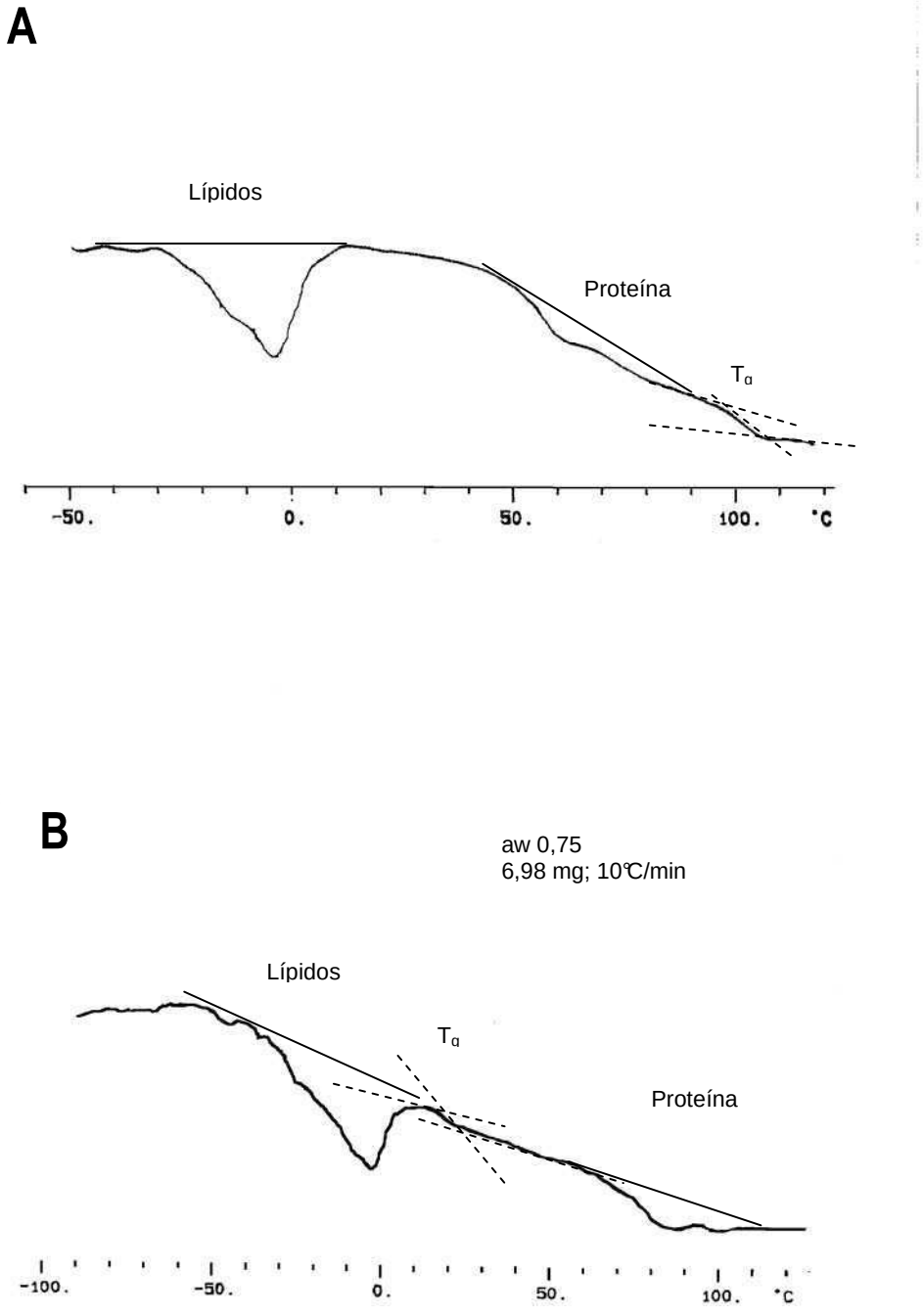


Fig. 3.V.1.- Termogramas obtenidos por DSC para semillas de sauce equilibradas a actividades de agua de: 0.11 (**A**); 0.75 (**B**).

Para algunas muestras, las temperaturas de transición vítreas fueron difíciles de determinar, debido a la superposición de las mismas con las transiciones de los lípidos, que se extendieron en un rango amplio de temperaturas. En la Figura 3.V.2 se indica por medio de de flechas el valor probable de las temperaturas de transición vítrea para muestras de distintas actividades de agua.

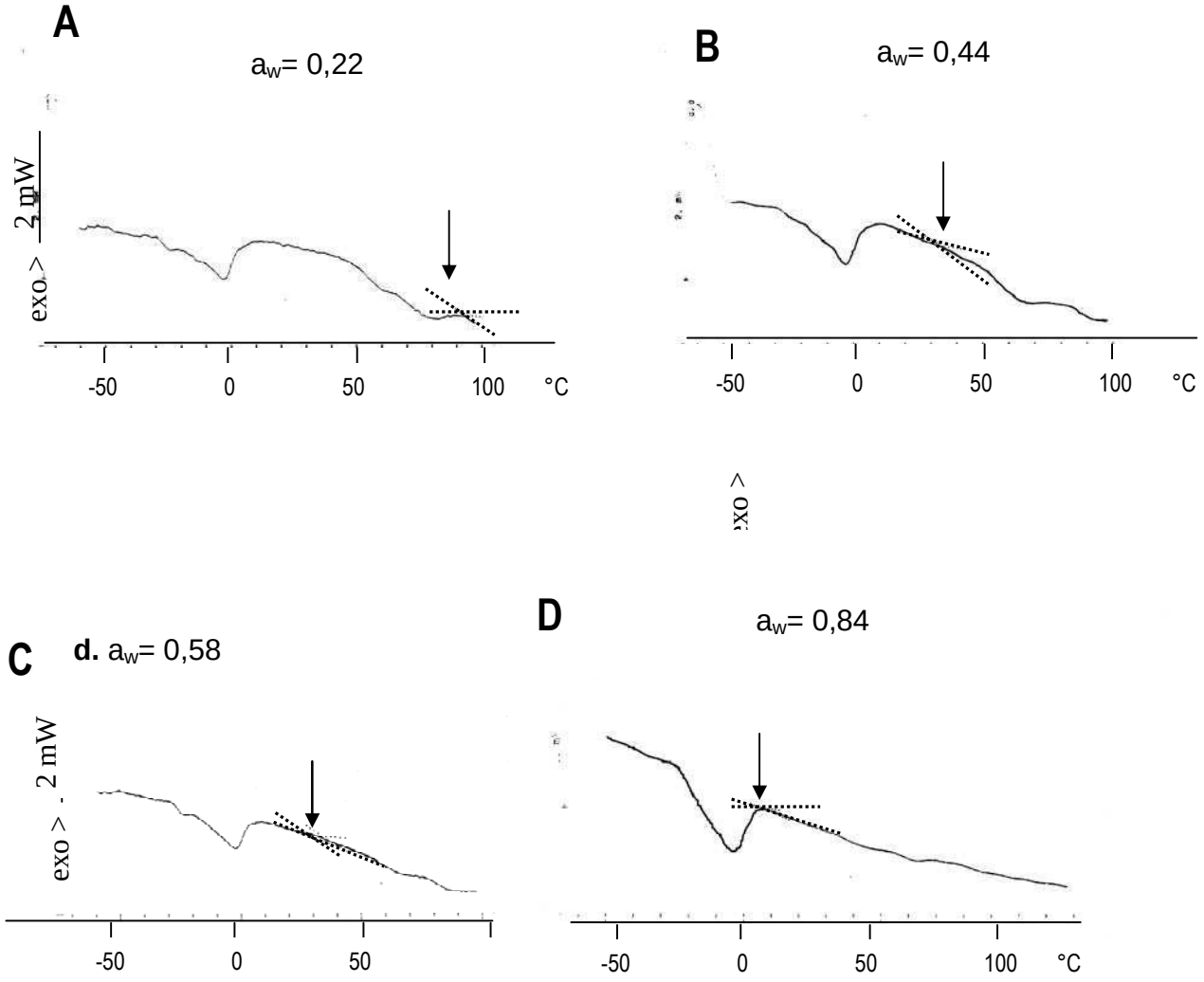


Fig. 3.V.2.- Termogramas obtenidos por DSC para semillas de sauce equilibradas a actividades de agua de: 0.22 (**A**); 0.44 (**B**); 0.58 (**C**); 0.84 (**D**).

Cuando se extrajeron los lípidos de las semillas los eventos térmicos atribuidos a la fusión de lípidos, disminuyeron significativamente. Por otra parte, según se observa en la figura 3.V.3 las transiciones térmicas del extracto lipídico muestran eventos endotérmicos que coinciden con los observados en la semilla completa. Aparece en la semilla, además, una transición endotérmica entre 60 y 90° C que ha sido observada en otras semillas, que desaparece luego de barridos subsecuentes. Leprince y Walter-Vertucci (1995), Sun y col. (1998) y Sánchez del Ängel y col. (2003) mostraron transiciones similares en poroto y productos a base de maíz, respectivamente. Estos picos son típicos y se consideran debidos a desnaturalización de proteínas. Hasta una humedad relativa de 84% no se observó agua congelable (ya que no se observan ninguna de las transiciones del agua, como cristalización /fusión cerca de 0° C).

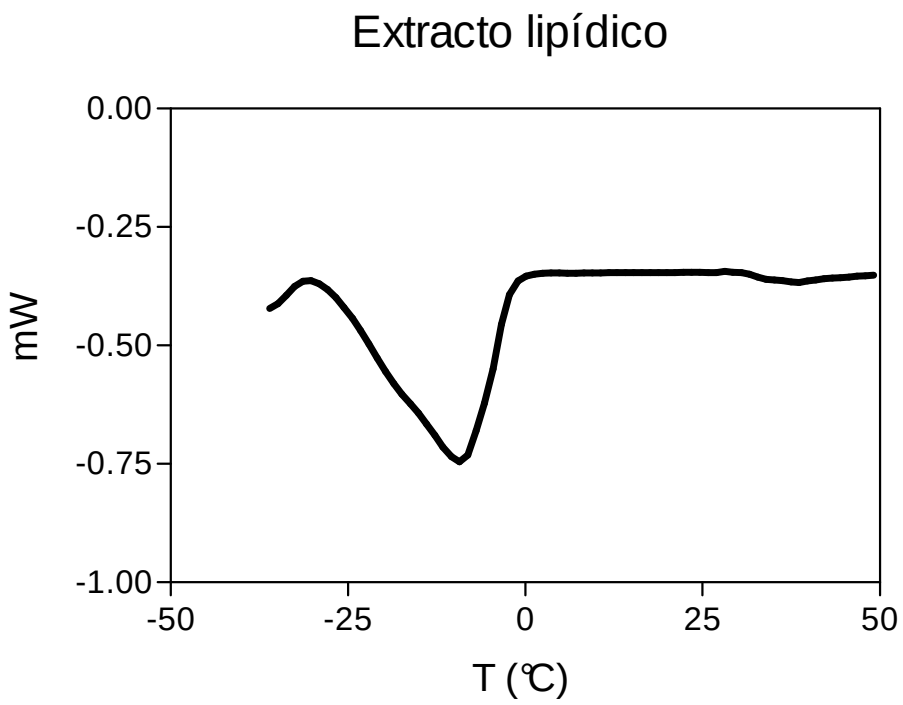


Fig. 3.V.3.- Termograma obtenido por DSC (5° C / min) del extracto lipídico de las semillas de sauce.

El aumento de la humedad relativa de equilibrio, produjo una disminución del valor de la probable Tg. Según se muestra en la figura 3.V.4. La movilidad molecular por encima de Tg es un factor importante que

puede influir en la estabilidad del material biológico dado que puede influir en la velocidad de reacciones de deterioro, disminuyendo la longevidad. Como se observa en la misma figura, a 25° C, el contenido de agua límite para que la semilla se encuentre en estado vítreo debe ser menor que 10%.

Pequeños aumentos de la temperatura o de la humedad relativa provocan el pasaje del estado vítreo al estado menos estable de líquido sobreenfriado. De esta forma, para mejorar la estabilidad de las semillas, la temperatura es la variable que podría ajustarse. De acuerdo con la misma figura, para mantener el estado vítreo, las muestras con humedades superiores a 10% deberían conservarse bajo refrigeración o congeladas. Sin embargo, los puntos marcados en la curva, corresponden a temperaturas a las que la germinación muestra un decaimiento relativamente rápido que no parecería compatible con un estado de alta viscosidad como es el vítreo. Al respecto, no se descarta que esa situación pueda deberse a causas no excluyentes entre sí, como un estado del contenido celular con alta porosidad lo que facilitaría la difusión del oxígeno y, por ende, las reacciones de autooxidación y/o a la estructura celular más compleja (menos homogénea) que tienen estas semillas respecto de las ortodoxas longevas, debido a que en ellas el proceso de desdiferenciación celular (capítulo 3.II) es menos acentuado.

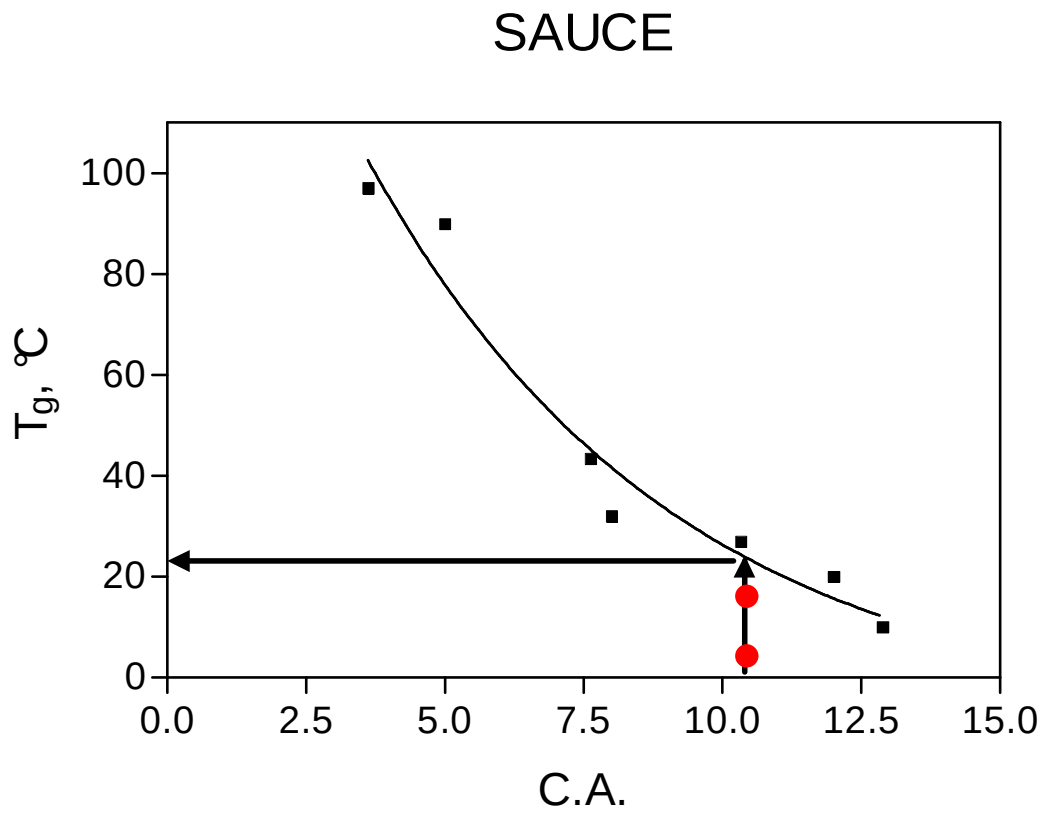


Fig. 3.V.4.- Temperatura de transición vítrea (Tg) obtenida para semillas de sauce de distintos contenidos acuosos (ca) en g/100 g de sólido seco. Los cículos sobre la flecha represwentan las condiciones experimentales analizados

(b). MOVILIDAD MOLECULAR

INTRODUCCIÓN

La resonancia magnética nuclear protónica de baja resolución (TD-NMR) ha sido empleada para estudiar el estado del agua y los cambios metabólicos en muchos sistemas biológicos. La relajación transversal de los protones del agua ha sido utilizada para describir la compartimentación del agua en los tejidos (Ratcliffe 1994). Las moléculas de agua que son más o menos móviles tienen diferentes tasas de relajación, pudiendo calcularse sus cantidades relativas (Krishnan y col. 2004). En comparación con los métodos gravimétricos, las técnicas de RMN pueden proveer información más detallada sobre el contenido y el estado del agua en las semillas con diferentes contenidos de agua durante el almacenamiento (Krishnan 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinaron los tiempos de relajación espín espín de semillas de sauce, equilibradas a actividad de agua de 0,52, que presentaban contenidos acuosos cercanos al 10%, los que se compararon con los resultados obtenidos de otras semillas de tamaño similar, equilibradas a la misma actividad de agua. Los resultados se muestran en la Tabla 3.V.1.

El análisis de la señal de relajación transversal determinados por FID para las semillas secas mostraron que el decaimiento de la señal podía ser representado por una curva exponencial de primer orden, y que el tiempo de relajación de las semillas de sauce supera al de las otras. Esto indica una mayor movilidad molecular que sería consistente con el más rápido deterioro que muestran estas semillas, si bien la diferencia en las movilidades no guarda relación con la que existe entre las longevidades. De todas maneras, respecto de la aplicación de esta metodología o de la que detecta el movimiento de sondas (ESR espín probe para evaluar la movilidad molecular, es necesario tener en cuenta que, como consecuencia de la menor o incompleta desdiferenciación celular las semillas de sauce presentan un sistema más heterogéneo estructuralmente que el de las semillas ortodoxas típicas por lo que una estricta comparación de las

movilidades entre sauce y las otras semillas resultaría cuestionable. En concordancia con esto último surge la cuestión del grado de homogeneidad del sistema a evaluar que sea compatible con una confiable interpretación de los resultados. Sin embargo, un análisis de los ecos de espín a través de la secuencia Hahn exhibió diferencias de comportamiento para las semillas de sauce (Tabla 3.V.2).

	W	a_w	$T_{2\ FID}$ (µs)	IC (µs)	Amp. (%)
Cilantro	9,2	0,552	9,7	0,1	100
Valenciana	8,9	0,551	9,9	0,1	100
Trebi	8,7	0,553	8,9	0,1	100
Sauce	10,1	0,510	11,4	0,1	100
Trigo	11,0	0,547	9,0	0,1	100

Tabla 3.V.1.- Tiempos de relajación T_2 obtenidos por FID, para un modelo de decaimiento monoexponencial, con para semillas de distinto tipo. W contenido de agua en base seca; a_w: actividad de agua; I.C.: intervalo de confianza; Amp: amplitud relativa de la señal.

	$T_{2\ Hahn}$ (µs)	IC (µs)	Amp. (%)	$T_{2\ Hahn}$ (µs)	IC (µs)	Amp. (%)
Cilantro	37	4	100	- -	- -	- -
Valenciana	40	4	100	- -	- -	- -
Trebi	33	3	100	- -	- -	- -
Sauce	30	3	80	530	0,461	20
Trigo	33	3	100	- -	- -	- -

Tabla 3.V.2. Tiempos de relajación T_2 obtenidos por la secuencia de ecos de espín de Hahn para semillas de distinto tipo. IC: intervalo de confianza; Amp.: amplitud relativa de la señal, en porcentaje;
- -: no corresponde, ya que el modelo de primer orden fue el único adecuado.

En las semillas de sauce aquí estudiadas aparecieron dos poblaciones de protones, una, que da cuenta de alrededor del 80% de la señal, con tiempos de relajación de 30 microsegundos y una segunda población, correspondiente al 20% de la señal, con un tiempo de relajación de 530 microsegundos. La secuencia de Hahn detecta movilidades intermedias cuando ya han relajado los protones menos móviles. Para el resto de las semillas más del 99% de los protones decayó en un tiempo de relajación cercano a 30 microsegundos. La presencia de la segunda población de protones, mucho más móviles, según lo que indica su mayor tiempo de relajación, probablemente esté asociada a la presencia de vacuolas, tal como se observó por microscopía electrónica (Capítulo 3.II de esta tesis).

Cuando las semillas de sauce se humedecieron durante toda la noche, la actividad de agua de las mismas aumentó a 0.97 y se repitieron las determinaciones para detectar si en ese estado hídrico la presencia de agua libre podría distinguir algún comportamiento diferencial de las semillas de sauce con respecto a las ortodoxas típicas. En este caso, la aplicación de la secuencia de Hahn permitió detectar que el decaimiento de la señal se podía representar por una función de decaimiento bi-exponencial para el caso de sauce y mono-exponencial para el resto de las semillas. Para las semillas de sauce húmedas se determinó una primera población de alrededor de 30 μs y una segunda cercana al milisegundo (844 μs). Para el resto de las semillas el decaimiento fue en tiempos del orden de 60 a 120 μs (Tabla 3.V.3).

	$T_{2\ Hahn}$ (µs)	IC (µs)	Amp. (%)	$T_{2\ Hahn}$ (µs)	IC (µs)	Amp. (%)
Cilantro	97	2	100	- -	- -	- -
Valenciana	121	20	100	- -	- -	- -
Trebi	64	3	100	- -	- -	- -
Sauce	30	4	23	844	123	77
Trigo	57	10	100	- -	- -	- -

Tabla 3.V.3.- Tiempos de relajación T_2 luego de la secuencia de eco de espín de Hahn para semillas humedecidas. IC: intervalo de confianza; Amp.%: porcentaje de intensidad de la señal.

- -: no corresponde, ya que el modelo de primer orden fue el único adecuado

De modo similar a lo que sucede en las semillas secas, en las semillas húmedas de sauce también se detectaron dos poblaciones de protones aunque con mayor movilidad (Tabla 3.V.3). En el resto de las semillas, por este método, sólo se detecta sólo una.

Mediante el análisis de los tiempos de relajación por eco de espín, luego de la aplicación de la secuencia CPMG se puede estudiar el comportamiento de las fracciones de protones más móviles. Ya que la aplicación de esta secuencia involucra la aplicación de tiempos de varios pulsos y tiempos de interpulsos, la medición se realiza cuando las poblaciones de protones menos móviles se han relajado, y por eso se detecta únicamente el comportamiento de los protones más móviles. En este caso, se pudo determinar que el decaimiento era tri-exponencial (lo cual indica la presencia de por lo menos tres poblaciones de protones de alta movilidad). Como muestra la Tabla 3-V-4, la primera población corresponde a protones que relajan en el orden de 5 a 10 ms, la segunda entre 15 y 50 y la tercera (más móvil) de 77 a 170 ms. En este caso las semillas de sauce muestran tiempos de relajación dentro del rango del resto de las semillas, y quizá una pequeña diferencia en la distribución de movilidades, ya que presentan una proporción levemente menor que el resto de las semillas de la tercera población (más móvil).

	$T_{2\ CMPMG}$ (ms)	IC (ms)	Amp. (%)	$T_{2\ CPMG}$ (ms)	IC (ms)	Amp. (%)	$T_{2\ CPMG}$ (ms)	IC (ms)	Amp. (%)
Cilantro	13	1	39	46	10	34	164	10	26
Valenciana	8,7	0,4	43	32	2,2	38	136	10	19
Trebi	3,8	0,1	47	19	0,7	35	71	2	19
Sauce	4,3	0,1	44	15	0,3	32	96	1	12
Trigo	4,8	0,2	49	17	0,7	36	77	3	15

Tabla 3.V.4.- Tiempos de relajación T_2 luego de la secuencia de eco de espín CPMG para semillas humedecidas. IC: intervalo de confianza; Amp.%: porcentaje de intensidad de la señal

El análisis de los diferentes tiempos de relajación T_2 obtenidos según FID, Hahn y CPMG indica que la diferencia de comportamiento más notable en cuanto a la movilidad de los protones corresponde a las semillas con contenido acuoso cercano al 10%, que es el que alcanzan las semillas cuando se deshidratan naturalmente.

En un trabajo de investigación reciente sobre semillas de quinoa (Castellion 2008) se reporta que la tercera población de protones cuyo tiempo de relajación es del orden de 100 ms, correspondía a los protones de los lípidos más móviles ya que su amplitud y tiempo de relajación no variaba con el contenido de agua (Castellión 2008). De esta manera se podría atribuir a los lípidos una importante contribución de los protones de dicha población.

(c). PROPIEDADES DE SORCIÓN- ISOTERMAS DE SORCIÓN

INTRODUCCIÓN

El contenido de agua en las semillas es ciertamente el factor más importante para determinar sus características de almacenaje. En general, las humedades adecuadas para el almacenamiento de semillas ortodoxas se encuentran entre 7 y 10% (base en masa seca) (Leopolds 1990).

La actividad de agua (a_w), es una medida indirecta del agua que está disponible en un dado material para participar en diferentes reacciones deterioriativas y en el crecimiento microbiano.

En el equilibrio, a temperatura constante, las actividades de agua de los componentes de una mezcla son iguales, mientras que los contenidos de agua pueden no serlo. La actividad de agua está relacionada con la humedad a través de la isoterma de sorción de agua. Su valor varía entre 0 y 1.

$$a_W = \frac{p_{V(H_2O)}}{p_{V(H_2Opura)}} \approx T^o = cte. \qquad \textbf{1.1}$$

Donde:

a_w es la actividad de agua

p es la presión de vapor de agua en el sustrato a la temperatura T

p_0 es la presión de vapor del agua pura a la temperatura T

Esta igualdad se basa en asumir la existencia de equilibrio termodinámico. Generalmente en sistemas complejos, como las semillas, esta condición puede no cumplirse y por ello sería más correcto usar el término presión de vapor relativa (PVR) en lugar del término a_w (Fennema, 1996).

En el equilibrio, la relación entre la a_w y la humedad relativa (HR) está dada por la ecuación siguiente:

$$a_w = \frac{HR}{100} \qquad \textbf{1.2}$$

El contenido de agua es simplemente una medida de la concentración de agua en la semilla. En el equilibrio, el contenido de agua se relaciona con la humedad relativa o a_w mediante las isotermas de sorción. Las isotermas de sorción de diferentes materiales biológicos muestran un curva de forma sigmoidal reversa (Leopold y Vertucci,1986; Vertucci y Leopold, 1987, Ishida y col, 1988; Roberts y Ellis, 1989).

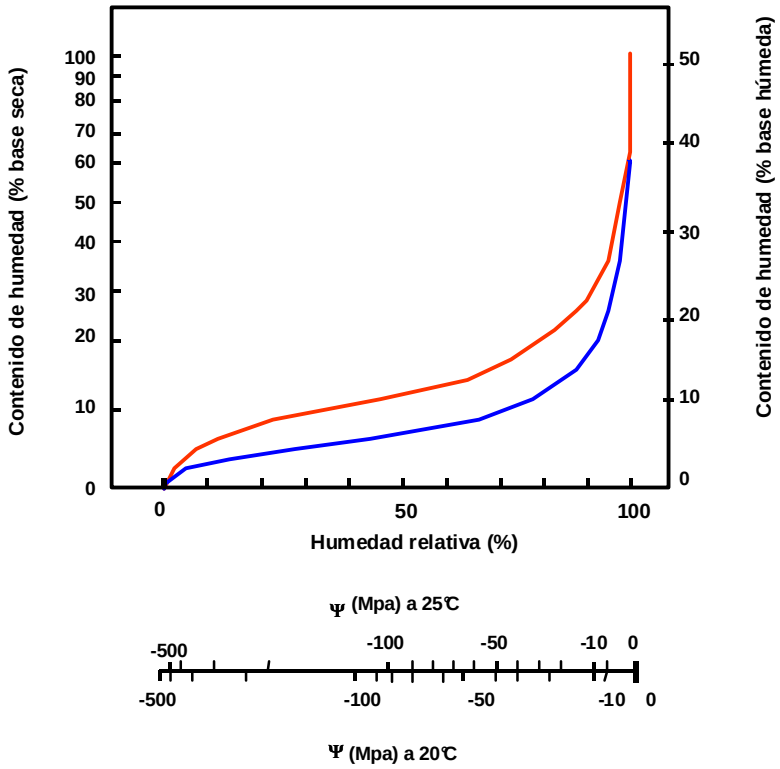


Figura 3.V.5.- Isoterma de sorción de semillas de lechuga (azul) y de cebada (roja) a temperatura constante (Ellis y Roberts, 1980). El contenido de agua se muestra como % en base húmeda y % en base seca.

De acuerdo con dichas curvas y estudios calorimétricos, se han clasificado al menos 5 rangos de agua o niveles de hidratación en los tejidos de semillas ortodoxas y recalcitrantes (Vertucci, 1989, 1990; Berjak y col., 1990, 1992; Pammenter y col, 1991). En la región 1 (de 0 a 8-10 g H_2O/ 100g de masa seca), las moléculas de agua están asociadas fuertemente a superficies macromoleculares por enlaces iónicos y se comportan como un ligando antes que como un solvente. La energía de atracción es estimada como –50kJ mol^{-1}.

En la región 2 (8-22%), el agua forma parte de vidrios generados por los sólidos (Williams & Leopold, 1989) y la energía de atracción disminuye a cerca de –2kJ mol^{-1} sugiriendo una interacción débil con la superficie macromolecular (Vertucci, 1989). Cuando su concentración está cerca del 22%, el agua recupera sus propiedades de solvente y aparecen algunas actividades metabólicas. Las moléculas de agua correspondientes a las regiones de hidratación 1 y 2 se conocen tradicionalmente como "agua ligada", que da cuenta de la gran interacción de estas moléculas con los sólidos.

Las propiedades térmicas del tercer nivel de hidratación (22-33%) aparentan ser de una solución concentrada. A este nivel de hidratación se puede medir la respiración (Leopold & Vertucci, 1989). En la región 4 (33-55%) y 5 (encima del 55%), el agua exhibe propiedades térmicas similares a una solución diluida. Encima del 55 % de contenido de humedad, los tejidos de las semillas están completamente hidratados, permitiendo que se lleve a cabo el proceso de germinación.

Estudios de la influencia de la actividad de agua (a_w) en la velocidad de las reacciones químicas indican que a bajas actividades, el agua no está disponible para actuar en reacciones químicas debido a que esta se encuentra fuertemente ligada a la superficie de sitios polares. A más altas actividades, el agua existe en multicapas o dentro de capilares como fase condensada y la movilidad del sistema se incrementa. Esta situación es atribuible a las diferencias de intensidad con la que el agua se asocia con los constituyentes no acuosos. El agua unida fuertemente está menos disponible para las reacciones degradativas, tales como el crecimiento de microorganismos y las reacciones químicas hidrolíticas, que el agua que tiene asociaciones débiles.

A una dada humedad relativa, la diferencia del contenido de agua en el equilibrio entre semillas de diferentes especies puede variar, ya que depende de la composición del citoplasma (Vertucci & Leopold1987). Más aún, la intensidad y naturaleza de la interacción del agua con los sólidos de las semillas incide sobre la velocidad de las reacciones de deterioro (Vertucci & Ross 1993; Leopold & Vertucci 1989). Por lo tanto, las características de sorción de las semillas pueden tener influencia sobre la variación de la

longevidad de las semillas entre diferentes especies (Eira y col. 1999) o, aún, entre distintos cultivares aunque la relación entre la capacidad de unión del agua y el comportamiento en el almacenamiento no ha sido confirmada.

Modelado de las isotermas de sorción de agua

El modelado de las isotermas de sorción de agua es particularmente importante para predecir la vida media de alimentos de humedad baja e intermedia (Labuza, y col., 1970; Labuza, 1980; Simatos & Karel, 1988). Las ecuaciones de Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Brunauer, y col., 1938) y Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) (van den Berg, 1981) son modelos conocidos de isotermas de sorción que proveen el valor de humedad de monocapa. El valor de humedad de monocapa suele ser considerado como el contenido de agua óptimo para la estabilidad de alimentos de baja humedad. El modelo BET se deriva de un modelo de sorción que fue originalmente propuesto para la sorción física de un gas inerte en una superficie de un sólido, y sus dos supuestos son que la superficie tiene un área fija y geométrica, y que hay una diferencia grande entre la cantidad de energía liberada cuando una molécula llega a la superficie del mismo sólido o a un sitio donde ya está cubierto por otras moléculas de gas. De esta forma, el valor de monocapa se visualiza como la cantidad de gas que cubre la superficie expuesta del sólido completamente con una capa de una molécula de grosor (van den Berg, 1981). La aplicabilidad del modelo BET se limita a a_w en el rango de 0,1 a 0,5 (Labuza, 1968), pero el modelo GAB se puede aplicar sobre un rango más amplio de a_w (van den Berg, 1981).

El modelo BET es empleado para estimar las superficies de sorción de gases en materiales porosos a fin de conocer su grado de porosidad, tipo, distribución de tamaño de poro y volumen medio de poros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Isotermas de sorción de sauce comparadas con otras semillas

La figura 3.V.6 muestra la isoterma de sorción de agua obtenida para semillas de sauce a partir de los datos de contenido acuoso a cada humedad de equilibrio empleada.

Se empleó la ecuación GAB para describir las isotermas de sorción de sauce, empleando el método de cuadrados mínimos para minimizar la diferencia absoluta entre los valores experimentales y calculados a través del modelo. Esta ecuación GAB se ha empleado para varios materiales biológicos y es aplicable en un amplio rango de contenido acuoso. Las constantes GAB m_0, C y k, se obtuvieron empleando la forma cuadrática:

$$\frac{a_w}{m} = \left(\frac{1}{m_0 Ck}\right) + \left(1 - \frac{2}{C}\right)a_w + \left(\frac{\left(\frac{1}{C} - 1\right)k}{m_0}\right)a_w^2$$

donde: m es el contenido de agua; m_0 es el valor de humedad de monocapa GAB, C es la constante de Guggenheim, relacionada con el calor de sorción de la primera capa de moléculas, sobre los sitios primarios y k es un factor que corrige las propiedades de la multicapa de agua respecto de las del agua . C y k están relacionados con la energía de interacción entre la mono y multicapa y reflejan el efecto de la temperature en las propiedades de sorción. k es prácticamente sin excepción cercano a 1, pero menor.

La bondad del ajuste se evaluó a través de la desviación porcentual (%E) entre los valores experimentales y los calculados, para lo cual se empleó la siguiente ecuación:

$$\%E = \frac{100}{n}\sum\frac{|m - mi^*|}{m}$$

Donde: n es el numero de mediciones, m es el contenido acuoso experimental y mi* es el contenido acuoso calculado mediante el modelo.

Los parámetros obtenidos para GAB, m_o, k y C se muestran en la Tabla 1 junto con el de las semillas de especies originarias del desierto de Atacama, pertenecientes a los géneros *Alona, Bálsamo* y *Nolana*,

algunas extremadamente tolerantes a la desecación. Las constantes k fueron menores que 1 para todos los materiales analizados [27]. Es interesante notar que tanto la llamada humedad de monocapa como las constantes k y c no muestran diferencias para las semillas que tienen distinta tolerancia a la desecación. En el trabajo de Vertucci & Leopolds (1987) se sugiere que las semillas intolerantes a la desecación presentan curvas de sorción hiperbólicas, caracterizadas por la ausencia de sitios de sorción en la región 1. Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, no es posible distinguir las semillas de sauce, de otras de estabilidad mucho mayor, por el análisis de las propiedades de sorción.

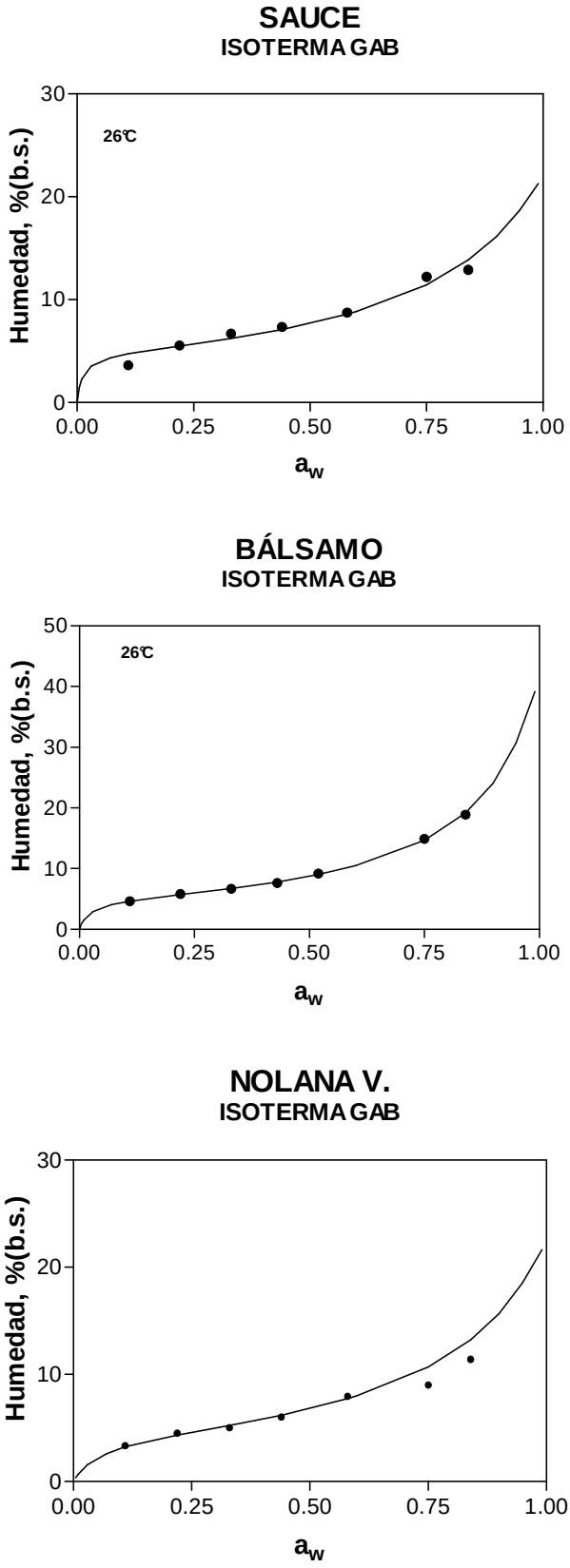


Figura 3.V.6.- Isoterma de sorción de agua de semillas de sauce (mediciones por duplicado).

Los datos obtenidos a través de la aplicación del modelo GAB se pueden observar en la Tabla 3.V.5.

Muestra	m_o[a] (%d.b.)	k[b]	C[b]	%E[c]	Referencias
Sauce	5.7	0.697	17.7	4	Presente estudio
Quinoa, cv.BaerII	5.0	0.873	23	3	Matiacevich y col. 2006
Quinoa cv.Ollagüe	4.5	0.87	52	3.2	Matiacevich y col. 2006
Quinoa cv.Chadmo	4.7	0.88	56	3.4	Matiacevich y col. 2006
Lechuga	4.6	0.913	7.5	4	Ellis y Roberts 1995
Nolana villosa	5	0.679	19.1	5	Schebor y col. 2002
Bálsamo	5.1	0.872	39.8	3	Schebor y col. 2002
Cebada	7.3	0.807	51.12	7	Ellis y Roberts 1980
Amaranto	10.2	0.81	16.8	5	Pollio y col. 1998
Bálsamo	10.2	0.62	18.6	6	Timmermann y col. 2001

Table 3.V.5.- Constantes de la ecuación GAB y bondad del ajuste aplicado a las isotermas de sorción de semillas de sauce y comparación con los valores de otras semillas.

[a] Contenido de agua necesario para cubrir la superficie de los sitios más polares con una molécula de agua. (m_o).

[b] Factor de corrección de las propiedades del agua en multicapas con respecto al agua líquida.

[c] Guggenheim constant

[d] Desvío relativo porcentual.

Isotermas de adsorción de Nitrógeno

Debido a que el aire presente en las semillas puede ser un factor muy importante para determinar la velocidad de deterioro de las semillas, se evaluó la superficie de las semillas de sauce expuesta a aire, a

través de las isotermas de adsorción de nitrógeno, que se grafican en la figura 3.V.6. Para comparación se realizó el análisis también en semillas de trigo. La forma de las curvas de ambos materiales corresponde a la clasificación de isotermas tipo II según las isotermas estándar de IUPAC (se trata de sólidos de baja porosidad), y en ellas puede observarse que la adsorción de N es mayor en las semillas de sauce que en las de trigo en todo el rango de presiones parciales.

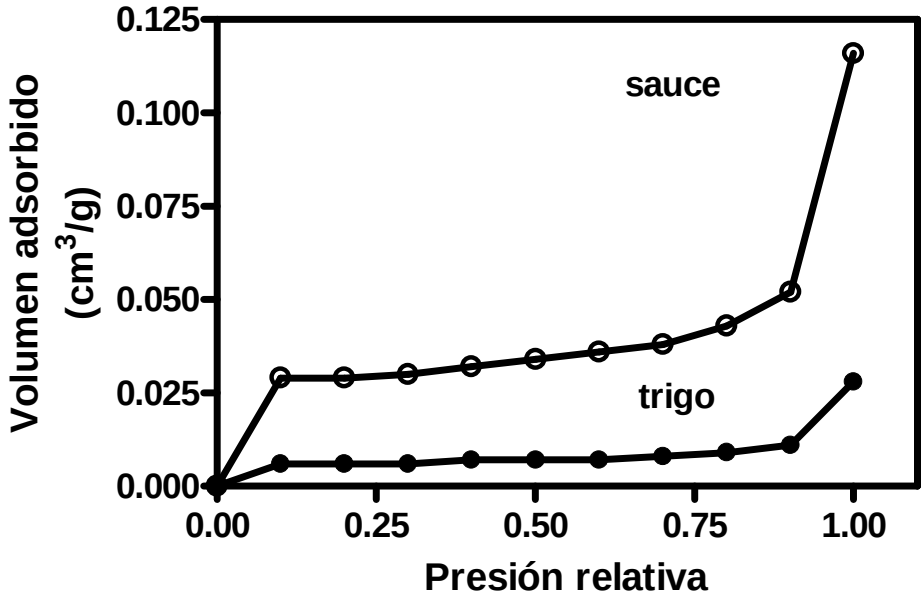


Figura 3.V.6.- Isotermas de adsorción de nitrógeno para semillas de sauce y para granos de trigo.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de las isotermas de adsorción de nitrógeno se encuentran tabulados en la Tabla 3.V.6 en la cual se incorporó además el área superficial para la adsorción de agua (SW_{GAB}) calculada a partir de los datos obtenidos mediante la ecuación de GAB, de la sección anterior:

$$SW_{GAB} = \frac{moNa}{M}$$

Donde SW_{GAB} es la superficie para adsorción de agua (m^2/g), m_o es elcontenido de agua de monocapa obtenido por GAB (gH_2O/g/ N es el número de Avogadro (6.02 x 10^{23} moléculas/mol); M es la masa molar de agua (18 g/mol) y *a* es el área de una molécula de agua (10.6 x 10^{-20} m^2/molécula).

Especie	SN_{BET} (m^2/g)	V_m (cm^3/g)	SW_{GAB} (m^2/g)
Trigo	0.0212	0.00487	354.50
Sauce	0.0800	0.01839	202.07

Tabla 3.V.6.- Superficies específicas para la adsorción de nitrógeno calculada por BET (SN_{BET}) y para la adsorción de agua calculada por GAB (SW_{GAB}) para semillas de trigo y sauce.

Como lo indican los datos obtenidos, el área para la adsorción de gases es muy baja en ambas semillas con respecto a los materiales que normalmente se analizan por esta metodología (catalizadores, polvos, etc.). Además, para semillas de sauce es casi cuatro veces superior que para granos de trigo. Al respecto, cabe mencionar que no existen referencias sobre la medición de la porosidad en semillas, metodología que por los resultados obtenidos podría aportar una información muy útil para diferenciar comportamientos y susceptibilidad a la oxidación. A su vez, el volumen medio de poro es también cuatro veces mayor en las semillas de sauce que en las de trigo. La mayor área superficial y el mayor poro indican una porosidad de las semillas superior a la de los granos de trigo analizados. A su vez, para ambas semillas, las áreas específicas para la adsorción de agua es tres órdenes de magnitud mayor que las correspondientes a la adsorción de nitrógeno, lo que es consecuencia de la alta hidrofilicidad de ambos materiales, siendo esta superior para los granos de trigo. Estos resultados son concordantes con la conclusión que se derivó de los capítulos anteriores acerca de que la causa del rápido deterioro parecería deberse a ciertas propiedades del

contenido celular, especialmente, a una porosidad mas elevada que la de otras semillas ortodoxas, mucho más longevas.

CAPÍTULO 5

BIBLIOGRAFÍA

Aluko, RE. 2004. The extraction and purification of proteins: an introduction En: Yada RY, ed. Proteins in food processing. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, pp. 323-351.

Arnon DI.1949. Copper enzimes in isolated cloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris. Plant Physiology.* **24** :1-15.

Arya SR, Bhagat S & Virendra-Singh I. 1988. Preliminary studies on seed germination and viability of *Salix alba* and *Salix elegans*. *Van Vigyan* **26**: 88-90.

Asada K. **1994.** Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. En: Foyer CH, Mullineaux PM, eds. *Cause of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants.* Boca Ratón: CRC, pp. 77-104.

Bailly C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* **14:** 93-107.

Baldan B, Bonaldo A, Rascio N, Vitale A, Meggio F, Profumo P & Mariani P. 1995. *Cercis siliquastrom* L.: a comparative study of endosperm and embryo development and reserve accumulation. *International Journal of Plant Science* **156**: 181-187.

Benson EE. 1990. *Free radicals damage in stored plant germoplasm.* Rome: International Board for Plant Genetic Resources.

Bewley JD, Black M. 1994. *Seed physiology of development and germination.* 2nd ed. New York: Plenum Press.

Berjak P, Farrant JM & Pammenter NW. 1990. The basis of recacitrant seed behavior. Cell biology of the basis of recalcitrant seed behavior. Cell biology of the homoiohydrous seed condition. En Taylorson RB, ed. *Recent advances in the development and germination of seeds.* New York: Pleum Press, pp. 89-108.

Berjak P, Pammenter NW & Vertucci C. 1992. Homohydrous (recalcitrant) seeds. Developmental status, desiccation sensibility and the state of water in axes of *Landolphia kirkii* Dyer. *Planta* **186**: 249-261.

Bol'shakow NM. 1988. Some information on the dispatch, storage and viability of seed of *Chosenia arbutifolia*. *Byulleten'Glavnogo Botanicheskogo Sada* **180**: 69-72 (*Seed Abstracts* 1992, 15, N8 3292).

Boveris A, Puntarulo SA, Roy AH & Sánchez RA. 1984. Spontaneous cheminiluminiscence of soybean axis during imbibition. *Plant Physiology* **76**: 447-451.

Boveris A, Sánchez RA, Vassavsky AI, Cadenas E. 1980. Spontaneous chemiluminiscence of soybean seeds. *FEBS Lett.* **113**: 29-32.

Bradford KJ. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. *HortScience* **21**: 1105-1112.

Bray CM, Davison PA, Ashraf M & Taylor RM. 1989. Biochemical changes during priming of leek seeds. *Annals of Botany* **63**: 185-193.

Brinkman KA. 1974. *Salix* L. Willow. En: *Seeds of woody plants in the United States. United States Department of Agriculture Agriculture handbook (US Department of Agriculture)* **450**: 746-749.

Bronner R. 1975. Simultaneous demonstration of lipids and starch in plant tissues. *Stain Technology* **50**: 1-4

Brunauer S, Emmet P & Teller E. 1938. Adsorption of gases in moltimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc*., **60:** 309-319.

Brown SB, Houghton JD & Hendry CAF. 1991. Chlorophyll Breakdown. En: Sheter H, ed. *The chlorophyll.* Boca Ratón: CRC Press, pp. 465-489.

Burgass RW & Powell AA. 1984. Evidence for repair processes in the invigoration of seeds by hydration. *Annals of Botany* **53**: 753-757.

Burke, MJ. 1986. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. En: Leopold AC,

ed. *Membranes, Metabolism and Dry Organisms.* Ithaca: Cornell University Press, pp. 358-363.

Castellión M. 2008. Procesos de deterioro y mecanismos de protección y reparación en la pérdida diferencial de la viabilidad durante el almacenamiento en semillas de *Chenopodium quinoa* Willdt. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Chojnowski M, Corbineau F & Côme D. 1997. Physiological and biochemical changes induced in sunflower seeds by osmopriming and subsequent drying, storage and aging. *Seed Science Research* **7**: 323-331

Crane J, Miller AL, Van Roekel JW & Walters C. 2003. Triacylglycerols determine the unusual storage physiology of *Cuphea* seed. *Planta* **217**: 699-708.

Crocker W.1938. Life span of seeds. *Botanical Review* **4**: 235-274

Dahlgren R. 1980. The taxonomical significance of chlorophyllous embryos in angiosperms seeds *Botanical Notiser*. **133**: 337-341.

Dalton, DA. 1995. Antioxidant defenses of plants and fungi. En: Ahmad, S, ed. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. New York: Chapman and Hall, pp. 298-355.

De Kok LJ & Kuiper PJC. 1977. Glycolipid Degradation in Leaves of the Thermophilic *Cucumis sativus* as Affected by Light and Low-Temperature Treatment. *Physiologia Plantarum* **39**: 123–128.

Densmore R & Zasada JC. 1983. Seed dispersal and dormancy patterns in northern willows: ecological and evolutionary significance. *Canadian Journal of Botany* **61**: 3207-3216.

Eira MTS, Walters C, Caldas LS, Fazuoli LC, Sampaio JB & Dias MCLL. 1999. Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. *Rev Bras Fisiol Veg* **11**: 97-105.

Ellis RH, Hong TD & Roberts EH. 1990. Effect of moisture content and method of rehydration on the susceptibility of pea seeds to imbibition damage. *Seed Science and Technology* **18**: 131-137.

Ellis RH & Roberts EH.1980a. Improved equation for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany* **45**: 13-30.

Ellis RH & Roberts EH. 1980b. The influence of temperature and moisture on seed viability period in barley (*Hordeum distichum* L.). *Annals of Botany* **45:** 31-37.

Ellis RH & Roberts EH. 1981. The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Science and Technology* **9**: 373-409.

El-Shishiny E & Thoday D. 1953. Inhibition of Germination in *Kochia indica. Journal of Experimental Botany* **4**: 10-22.

Farrant JM, Pammenter NW & Berjak P. 1989. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds – a study on three unrelated sptecies. *Planta* **178**: 189-198

Farrant JM, Pammenter NW & Berjak P. 1992. Development of thew recalcitrant (homoiohydrous) seeds of *Avicennia marina*: anatomical, ultrastructural and biochemical events associated with development from histodifferentiation to maturation. *Annals of Botany* **70**: 75-86.

Farrant JM, Pammenter NW, Berjak P & Walters C. 1997. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. *Seed Science Research* **7**: 135-144.

Feder N, O`Brien TP. 1968. Plant microtechniquews: some principles and new methods. *American Journal of Botany* **55**: 123-142.

Fennema O. 1996. Water and Ice O. En: Fennema O, *Food Chemistry* (3rd. Ed.). New York: Marcel Dekker, pp. 17-94.

Folch J, Lees M & Stanley GHS 1957. A simple method for the isolationand purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **226**: 497 – 509.

Foote CS. **1976.** Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. En: Pryor WA, ed. *Free Radicals Biology.* New York: Academic Press, pp. 85-133.

Foyer CH. 1996. Free radical processes in plants. *Biochemical Society Transactions* **24:** 427-433.

Friguet B, Saweda L & Stadtman ER. 1994. *Arch. Biochem. Biophys* **311**: 168-173

Fujikura Y, Kraak LH, Basva SA & Karssen CM. 1992. Comparison of the effects on germination of

osmopriming and hydropriming in cauliflower seeds. En: Côme D, Corbineau F, eds. *Fourth International Workshop on Seeds. Basic and Applied Aspects of Seed Biology*. Angers: Universite Â Pierre et Marie Curie, pp. 1021-1025.

Fulcher RG, O`Brien TP & Simmonds DH. 1972. Localization of the arginine rich-proteins in mature seeds of some members of the Gramineae. *Australian Jounal of Biological Sciences* **25**: 487-497.

Golovina EA & Tikhonov AN. 1994. The structural differences between the embryos of viable and nonviable wheat seeds as studied with the ESR spectroscopy of lipid-soluble spin labels. *Biochimica et Biophysica Acta* **1190:** 385–392.

Golovina EA, Tikhonov AN & Hoekstra FA. 1997. An electron paramagnetic resonance spin-probe study of membrane permeability changes with seed aging. *Plant Physiology* **114:** 383–389.

Graham, L. 1996. A comprehensive survey of the acid-stable fluorescent cross-links formed by ribose with basic amino acids, and partial characterization of a novel Maillard cross-link. *Biochimica et Biophysica Acta* **1297:** 9-16.

Gray D & Drew RLK. 1991. Comparison of polyethyleneglycol polymers betaine and L-proline for priming vegeTabla seed. *Seed Science and Technology* **19**: 581±590.

Halliwell B. 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection of chloroplasts. Chemistry and Physics of Lipids **44:**327-340

Halliwell B & Gutteridge JMC 1999. *Free Radical in biology and medicine*, 3rd Ed. New York: Oxford University Press.

Harrison PM & Arosio P. 1996. The ferritin: molecular properties iron storage, function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1275**: 161-203.

Hendry GA. 1993. Oxygen, free radical processes and seed longevity. *Seed Science Research* **3**: 141-153.

Hong TD & Ellis RH. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. En: Engels JMM, Toll J, eds. IPGRI technical bulletin 1. Rome: International Plant Genetic Resources.

Hong TD, Linington S & Ellis RH. 1996. Seed storage behaviour: a compendium (Electronic version). Rome: International Plant Genetic Resource Institute.

International Seed Testing Association. 1999. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* **27**: Supplement, Rules.

Ishida N, Kano H, Kovayashi T & Yoshida T. 1988. Analysis of physical states of water in soybean seeds by NRM. Agricultural and Biological Chemistry**. 52:** 2777-2781.

Inskeep WP & Bloom PR. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethyl-formamide and 80 % acetone. *Plant Physiology* **77**: 483-485.

Janzen DH. 1982. Ecological distribution of chlorophyllous developing embryos among perennial plants in a tropicalo deciduous forest. *Biotropica* **14**: 232-236.

Johansson M & Walles B. 1994. Functional anatomy of the ovule in broad bean (*Vicia faba* L.): ultrastructural seed development and nutrient pathways. *Annals of Botany* **74**: 233-244.

Justin OL & Bass LN. 1978. Principles and practices of seed storage. *United States Department of Agriculture Agriculture Handbook (US Department of Agriculture)* **506**: 57-77.

King MW & Roberts EH.1979. The storage of recalcitrant seeds. Achievments and posssible approaches. Rome: International Board Plant Genetic Resources.

Kjeldahl JA. 1883. A new method for determination of nitrogen in organic matter. *Anal Chem.* **22**: 366-382.

Klein S, Pollok BM. 1968. Cell fine structure. of developing lima bean seeds related to desiccation. *American Journal of Botany* **55**: 658-672.

Knox JP & Dodge AD. 1985. Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* **24**: 889-896.

Krishnan P, Joshi DK, Nagarajan S & Moharir AV. 2004. Characterization of germinating and non-viable soybean seeds by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Seed Science Research* **14,** 355–362.

Labuza T. 1980. The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Food Technology*

34: 36-41.

Labuza, T. 1968. Sorption phenomena in foods. *Food Technol.,* **24**: 543-550.

Labuza, T, Tannenbaum, S & Karel, M 1970. Water content and stability of low-moisture and intermediate moisture foods. *Food Technol.,* **24**: 543-550.

Leigh RA & Sanders D 1997. *The Plant Vacuole. Advances in Botanical research incorporating advances in plant pathology*. New York: Academic Press.

Leech RM & Murphy DJ. 1976. The cooperative function of chloroplasts in the biosynthesis of small molecules. En: *The intact chloroplast.* Barber, J, ed. New York: Elsevier, pp. 365–401.

Leopold AC. 1990. Coping with desiccation. En: Alscher JG & Cumming JR, eds. *Stress responses in plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*. New York: Wiley-Liss, Inc, pp 37-56.

Leopold AC & Vertucci CW. 1986. Physical atributes of desiccated seeds. En: Leopold AC, ed. *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*. New York: Cornell University Press, pp. 22-34.

Leopold AC & Vertucci CW, 1989. Moisture as a regulato of physiological reaction in seeds. En: Stanwood PC & McDonald MB, eds. *Seed Moisture.* CSSA Special Publication N° 14. Madison. Crop Science Society of America, pp. 51-67.

Leopold AC, Sun WQ & Bernal Lugo I. 1994. The glassy state in seeds: Analysis and function. *Seed Science Research* **4**:267-274.

Leprince O, Deltour R, Thorpe PC, Atherton MN & Hendry GAF. 1990. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays*) *New Phytologist* **116**: 573-580.

Leprince O, Buitinik J & Hoekstra FA. 1999. Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. Exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1515-1524.

Leprince O & Walters-Vertucci C. 1995. A calorimetric study of the glass transition behaviors in axes

of bean seeds with relevance to storage stability. *Plant Physiology* **109**: 1471-1481.

Levine H & Slade L. 1990. *Influences of the glassy and rubbery states on the thermal, mechanical, and structural properties of dough and baked products.* En: Daridi H & Faubion JM, eds. Dough rheology and baked products texture.New YorK: AVI. pp. 157-330.

Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* **148**: 350–382

Lim M & Reid D. 1991. Studies of reaction kinetics in relation to the Tg' of polymers in frozen systems. En: Levine H, Slade L, eds. *Water relationships in foods.* Plenum Press, New York pp 103-122.

Liu Y, Bino RJ, van der Burg WJ, Groot SPC, Hilhorst HWM. 1996. Effects of osmotic priming on dormancy and storability of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. *Seed Science Research* **6**: 49-55.

Lobreaux S & Briat JF. 1991. Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochemical Journal* **274**: 601-606.

Maldonado S & Lott JNA. 1991. Protein bodies in *Datura stramonium* seeds: structure and mineral nutrient composition. *Canadian Journal of Botany* **69**: 1545-1554.

Marin L & Dengler RE. 1972. Granal plastids in the cotyledons of the dry embryo of *Kochia childsii. Canadian Jounal of Botany* **50**: 2049-2052.

Maroder HL, Prego IA, Facciuto GR & Maldonado SB. 2000. Storage behaviour of *Salix alba* and *Salix matsudana* seeds. *Annals of Botany* **86**: 1017-1021.

Maroder HL, Urrutia ME, Facciuto G, Cerrillos. T. 1996.Efecto de la temperatura y el contenido de humedad en la germinación de semillas de sauce. Proceeding 20th. Session of the International Poplar Comission. Budapest. 604-608.

Maroder H, Prego I & Maldonado S. 2003. Histochemical and ultrastructural studies on *Salix alba* and *S. matsudana* seeds. *Trees* **17**: 193-199.

Matiacevich SB, Santagapita PR & Buera MP. 2005. Fluorescence from the Maillard reaction and its

potential application in food science. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* **45**: 483-495.

Matiacevich SB & Buera MP. 2006. A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction. *Food Chem.* **95:** 423-430.

Matiacevich SB, Castellión M, Maldonado SB & Buera MP. 2006. Water-dependent thermal transitions in quinoa embryos. *Thermochimica Acta* **448:**117–122.

McDonald MB. 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology* **27**: 177-237.

Murthy UM & Sun WQ. 2000. Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. *Journal Experimental Botany* **51**: 1221-1128.

Murthy UM, Liang Y, Kumar PP & Sun WQ. 2002. Non-enzymatic protein modification by the Maillard reaction reduces the activities of scavenging enzymes in *Vigna radiata*. *Physiologia Plantarum* **115**: 213-220.

Nandi S, Sen-Mandi S & Sinha TP. 1997. Active oxygen and their scavengers in rice seeds (*Oryza sativa cv.* IET 4094) aged under tropical environmental conditions. *Seed Science Research* **7:** 253-259.

Negbi M & Tamari B. 1963. Germination of chlorophyllous and achlorophyllous seeds of *Salsola volkensii* and *Aellenia autrani*. *Israel. Journal of Botany* **12**: 124–135.

O´Brien TP & McCully ME. 1981.*The study of plant structure. Principles and selected methods*. Melbourne: Thermacarphy.

Ohlrogge JB & Kernan TP. 1982. Oxygen-dependent aging of seeds. *Plant Physiology* **70**: 791-794.

Otegui M, MaldonadoS & Lima C, Lederkremer RM de. 1999. Development of the endosperm of *Myrsine laetevirens* (Myrsinaceae). II. Formation of protein and lipid bodies. International *Journal of Plant Science* **160**: 501-509.

Osborne TB. 1924. *The vegetable proteins.* Longmans, Green, London.

Palanisamy K. 1989. Chloroembryo: its occurrence, plastid formation, photosynthesis and biochemical components. *Photosynthetica* **23**:234-244.

Pammenter NW, Greggains V, Kioko JI, Wesley-Smith J, Berjak P & Finch-Savage WE. 1998. Effects of differential rates on viability retention of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. *Seed Science Research*

8: 463-471.

Pammenter NW, Vertucci CW & Berjak P. 1984. Recalcitrant seeds: short-term storage effects in *Avicennia marina* (Forsk.) may be germination associated. *Annals of Botany* **54**: 843-846.

Pammenter NW, Vertucci CW & Berjak P. 1991. Homeohydrous (recalcitrant) seeds; dehydration, the state of water and viability characteristcs in Landolphia kirkii. *Plant Physiology* **96**:1093-1098.

Pearce RS & Abdel Samad IM. 1980. Change in fatty acids content of polar lipids during aging of seeds of peanut (*Arachis hypogea* L.). *Journal of Experimental Botany* **31**: 1283-1290.

Pearse AGE. 1985. *Histochemistry. Theoretical and applied.* 4th edition. Churchill Livingstone, New York.

Pence VC. 1995. Cryopreservation of recalcitrant seed. En:.Baajaj YPS, ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin: Springer-Verlag, pp 29-30.

Periasamy K & Vivekanandan M. 1981. Photosynthesis in the chloroembryo of *Cyamopsis tetragonaloba* Taub. *Annals of Botany* **47**: 793-797

Pinfield NJ, Stobart AK, Crawford RM & Beckett A. 1973. Carbon assimilation by sycamore cotyledons during early seedling development. *Journal of Experimental Botany* **24**: 1203-1207.

Pólya L. 1961. Injury by soaking of *Populus alba* seeds. *Nature* **189**: 159-160.

Ponquett RT, Smith MT & Roos G. 1992. Lipid autixidation and seed ageing: putative relationships between seed longevity and lipids stability**.** *Seed Science Research* **2:** 51-54.

Powell AA & Matthews S. 1981. Association of phospholipids changes with early stages of seed aging. *Annals of Botany.* **47:** 709-712.

Prego I, Maldonado S & Otegui M. 1998. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany.* **82**: 481-488.

Pretová A& Vojteková M. 1985. Chlorophylls and carotenoids in flax. embryos during embryogenesis. *Photosynthetica* **19**:194–197 .

Priestley DA. 1986. *Seed aging. Implications for seed storage and persistence in the soil*. Ithaca: Cornell University Press

Priestley DA & Leopold AC. **1983**. Lipid change during natural agingof soybean seeds. *Plant Physiology* **59**: 467-470.

Pritchard HW & Seaton PT. 1993. Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. *Selbyana* **14**: 89-104.

Ratcliffe RG. 1994. In vivo nuclear magnetic resonance studies of higher plants and algae. *Advances in Botanical Research* **20**: 43-123.

Reznick AZ & Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*. **233**:357-36.

Rivet AJ. 1986. *Curr. Top Cell Reg.* **28**: 291-337

Roberts EH. 1972. *Viability of seeds*. New York: Siracuse University Press. Chapman and Hall Ltd.

Roberts EH. 1973. Loss of viability. Ultrastructural and physiological aspects. *Seed Science and Technolology* **1**: 29-34.

Roberts EH & Ellis RH. 1989. Water and seed survival. *Annals of Botany* **63**: 39-52

Roos, Y. 1992. Reaction kinetics and thermodynamics in food systems; Part II, Phase transitions and transformations. En Lund D & Heldman D, Eds. *Handbook of Food Engineering.* New York: Marcel Dekker, pp. 145-197.

Roos YH & Himberg MJ. 1994. Non-enzymatic browning behavior, as related to glass transition, of a food model at chilling temperatures. *J. Agric. Food Chem*. **42**: 893-898.

Roos Y & Karel M. 1991. Phase transitions of mixtures of amorphous polysacarides and sugars. *Biotechnol. Prog.* **7:** 49-53.

Sánchez del Ángel S, Moreno Martínez E & Valdivia López MA. 2003. Study of denaturation of corn proteins during storage using differential scanning calorimetry. *Food Chem.* **83:** 531-540.

Sato Y. 1955. On the viability of Salicaceae seeds. *Research Bulletins of the College of Experiment Forests, Hokkaido University* **17**: 225-266.

Schoebel T, Tannenbaum SR & Labuza TP. 1969. Reaction at limited water concentration. 1. Sucrose hydrolysis. *J. Food Sci.* **34**, 3249.

Skoog DA, Holler FG & Nieman TA. 2001. *Principios de Análisis Instrumental*. 5° edición. Mc Graw Hill/Interamericana, Madrid.

Seel W, Hendry G, Atherton N & Lee J. 1991. Radical formation and accumulation *in vivo*, in desiccation tolerant and intolerant mosses. *Free Rad. Res. Comms*. **15**: 133-141.

Simak M. 1982. Germination and storage of *Salix caprea* L. and *Populus tremula* L. seeds. En:Wang BSP, Pitel JA, eds. *Proceedings of the International Symposium of Forest Tree Seed Storage*, Petawawa/Canada: Environment Canada, Canada Forestry Service, pp.142-160.

Simatos D & Karel M. 1988. Characterization of the condition of water in foods: Physico-chemical aspects. En: Seow C, ed. *Food Preservation by Moisture Control*. New York: Elsevier, pp. 24-30.

Sivritepe HO & Dourado AM 1995. The effect of seed moisture cotent and viability on the susceptibility of pea seeds to soaking injury. *Scientia Horticulturae*. **61:** 185-191.

Smirnoff M. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* **125**: 27-58.

Smith MT & Berjak P. 1995. Deteriorative changes associated with the loss viability of stored desiccationtolerant and desiccation-sensitive seeds. En: Kigel J, Galili G, edts. *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, Inc. , pp 701-746.

Sperling, L. H. (1986) Cap. 5: The amorphous state. En: *Introduction to physical polymer science*. L.H. Sperling LH, ed. John Wiley & Sons, New York, pp. 165-200.

Stanwood PC. 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. En: Kartha KK, ed.

Cryopreservation of plant cells and organs. Florida: CRC Press, pp. 199-226.

Stewart RR & Bewley JD. 1980. Lipid Peroxidation Associated with Accelerated Aging of Soybean Axes. *Plant Physiology.* **65:** 245-248.

Sun WQ, Davidson P & Chan HS. 1998. Protein stability in the amorphous carbohydrate matrix: relevance to anhydrobiosis. Biochimica et Biophysica Acta 1425: 245-254.

Sun WQ & Leopold AC. 1995. The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. *Physiologia Plantarum* **94**: 94-104.

Szöcs F. 2002. Free radicals in wheat seeds studied by electron spin resonance. *Food Chemistry and Toxicology* **67**: 2079-2082.

Taiz L & Zeiger E. 1998. *Plant Physiology.* 2° Edición. Sunderland, Editorial Sinauer Associates.

Taylor AG, Allen PS, Bennett MA, Bradford KJ, Burris JS, & Misra MK. 1998. Seed enhancements. *Seed Science Research* **8**: 245-256.

Teng SC & Yu H. 1948. Propagation of weeping willow from seed. *Botanical Bulletin Academia Sinica* **2**: 131-132.

Thornber JB. 1975. Chlorophyll-proteins: light-harvesting and reaction center components of plants. *Annual Review of Plant Physiology* **26**: 127-158.

Usberti R & Valio IFM. 1997. Osmoconditioning effects on germination of guinea grass (Panicum maximum) seeds. *Seed Science and Technology* **25**: 303-310.

Van Hasselt PR. 1974. Photooxidation of unsaturated lipids in *Cucumis* leaf discs during chilling. *Acta Botanica Neerlandica* **23**: 159–169.

van den Berg C. 1981. Water activity and its estimation in foods systems: Theoretical aspects. En: Rockland G, ed. *Water Activity: Influences on Food Quality.* New York: Academic Press, 1-61.

Vertucci CW 1989. The effects of low water contents on physiological activities of seeds. *Physiologia Plantarum* **77**: 172-176.

Vertucci C. 1990. Calorimetric Studies of th estate of water in seed tisúes. *Biophysical Journal* **58**:

1463-1471.

Vertucci CW & Farrant JM. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. En: Kigel J; Galili G, eds. *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, pp. 237-271.

Vertucci CW & Leopold AC. 1987. The lipid peroxidation model of seed ageing**.** *Plant Physiology* **14:** 269-300.

Vertucci CW & Roos EE. 1993. Theoretical basis of protocols for seeds storage: II. The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Science Research* **3**: 201-213.

Wettlaufer S & Leopold AC. 1991. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. *Plant Physiology.* **97**: 165-169.

Williams, R. 1994. Methods for determination of glass transitions in seeds. *Annals of Botany* **74:** 525-530.

Williams RJ & Leopold AC..1989. The glassy state in corn embryos. *Plant Physiology.* **89**:977-981.

Wilson DO & Mc Donald MB. 1986. Oxidative processes in soybean and pea seeds**.** *Seed Science Research* **84:** 1038-1043.

Yagi K. 1976. A simple fluorometric determination for lipoperoxide involved in blood plasma. *Biochem. Med.* **15**: 212-216

Yakovlev MS & Zhukova G. 1980. Chlorophyll in embryos of angiosperm seeds. A review. *Botanical Notiser* **133**: 323-336.

Zasada JC & Densmore R. 1977. Changes in Salicaceae seed viability during storage. *Seed Science and Technology* **5**: 509-517.

Zasada JC & Densmore R. 1980. Alaskan willow and balsam poplar seed viability after 3 years storage. *Tree Planter's Notes* **31**: 9-10.

Zhukova GL & Yakovlev MS. 1966. Electronmicroscope study of the chloroplasts of a *Nelumbo nucifera* Gaertn. Embryo (in Russian) *Bot Zh Akad Nauk* **51**: 1542-1546.