REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA, 39, 409-416. 1983

Cambios en las fracciones de albúminas y globulinas en semillas de *Pinus pinea* durante el envejecimiento artificial

B. González-Juliá, M. Fernández García de Castro y C. J. Martínez-Honduvilla

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense, Madrid (España)

(Recibido el 7 de febrero de 1983)

B. GONZALEZ-JULIA, M. FERNANDEZ-GARCIA DE CASTRO and C. J. MARTINEZ-HONDUVILLA. *Changes on the Albumin and Globulin Fractions in Artificially Aged* Pinus pinea *Seeds.* Rev. esp. Fisiol., **39**, 409-416, 1983.

The alterations on the electrophoretic patterns of albumin and globulin fractions in both embryo and endosperms of *Pinus pinea* seeds during artificial ageing have been investigated. The results show that the electrophoretic patterns of aged seeds are drastically different from those of seeds with high germination capacity. These alterations were observed even when the quantitative analysis did not show any significant changes.

El proceso de envejecimiento en las semillas, directamente relacionado con la pérdida de capacidad y poder germinativo de las mismas, está siendo ampliamente investigado (1, 7, 16, 19, 21). Los resultados obtenidos por diversos investigadores, fundamentalmente en cereales, apuntan hacia una posible alteración a nivel cuantitativo de las fracciones proteicas celulares (3, 13, 18). En nuestro Departamento se había comprobado (11) cómo las semillas de *Pinus pinea* envejecidas artificialmente por un proceso de «envejecimiento acelerado» veían alterado su contenido proteico, principalmente en las fracciones albuminoideas y globulínicas. Por esta razón, se decidió abordar en el presente trabajo el estudio de los posibles cambios que a nivel cualitativo pudieran tener lugar en ambas fracciones proteicas. Dichos datos podrían aportar información útil para la mejor comprensión de la pérdida de la capacidad y poder germinativo observados durante el proceso de envejecimiento.

Material y métodos

Se han empleado semillas de pino piñonero (*Pinus pinea* L.) procedentes de Coca (Segovia, España), recolectadas en la cosecha de 1980 y con un 95 ± 5 % de capacidad germinativa, suministradas por el Instituto Forestal de Madrid. Las semillas fueron almacenadas a baja temperatura (4°C) hasta su utilización posterior.

Pruebas germinativas. Lotes de 25 semillas desprovistas de episperno, «semillas desnudas», fueron enterradas en placas Petri conteniendo 9 g de vermiculita como soporte inerte de imbibición y regadas con 30 ml de agua destilada. Las placas se mantuvieron durante un período de 7 días en cámara de germinación a 24-26°C y bajo luz fluorescente continua, al cabo del cual se contó el número de semillas germinadas, estableciéndose como dato el porcentaje de germinación. Como criterio de germinación se consideró que el tamaño de la radícula emergida fuera superior a 0,1 cm.

Envejecimiento artificial. El proceso de envejecimiento artificial o acelerado empleado consistió básicamente en provocar un aumento del 40 % en el contenido de humedad de las semillas, desprovistas de testa y endopleura, mediante un sistema de corriente de aire insuflado y saturado de humedad a 45°C y posterior almacenaje de las mismas a 45°C y humedad a saturación (11). Se tomaron muestras de semillas almacenadas bajo estas condiciones 0, 14 y 28 días, para las valoraciones pertinentes.

Extracción de fracciones proteicas solubles. La extracción de las fracciones albuminoidea y globulínica, por separado, se realizó siguiendo la técnica de GRZESIUK y KULKA (13) adaptada a la semilla de *Pinus pinea* (11).

Partes alícuotas de dichas fracciones fueron concentradas por liofilización, posterior disolución en un pequeño volumen de agua destilada y sometidas a electroforesis para la separación de sus distintos componentes.

Separación cualitativa de proteínas. Las electroforesis se realizaron sobre acetato de celulosa en tampón Veronal 0,04 M pH 8,6 durante dos horas, a una diferencia de potencial de 200 V para las fracciones albuminoideas y de 250 V para las fracciones globulínicas. Las tiras fueron sometidas a tinción con Negro Amido 10 B y tras su posterior decoloración se realizó la determinación cuantitativa de las bandas proteicas obtenidas, mediante la lectura en un fotodensitómetro modelo Chromoscan 200, Joyce Loebl. Se realizó también el cálculo de la correspondiente movilidad electroforética (m. e.) para cada una de las bandas, señalándose con valores negativos las que presentan una migración hacia el cátodo.

Resultados y discusión

La aplicación del sistema de envejecimiento artificial a semillas de *Pinus pinea,* ya discutido anteriormente (11) permitía la obtención de material de distinto grado de viabilidad en un período de tiempo relativamente corto, si se compara con el que se hubiera requerido por simple almacenaje a temperatura y humedad ambientales, es decir «envejecimiento natural» (9). Utilizando este rápido modelo experimental se abordó el

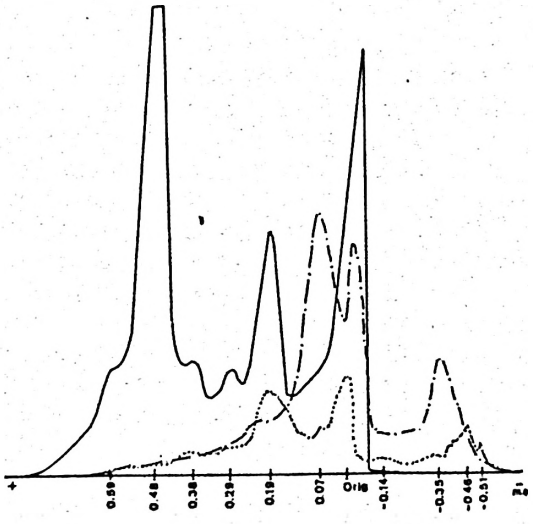

Fig. 1. *Efecto del envejecimiento artificial sobre la fracción albuminoidea de embrión de semillas «viables»* (————), *«medio viables»* (— · — · —) *y «no viables»* (.....), *en estado seco.*

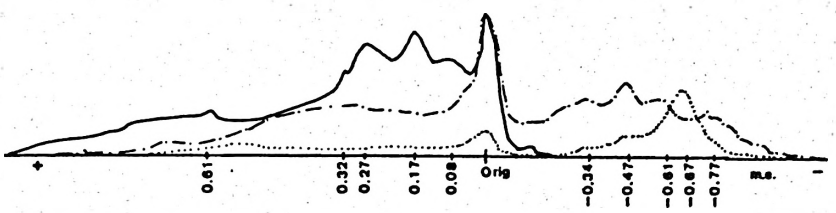

Fig. 2. *Efecto del envejecimiento artificial sobre la fracción albuminoidea de embrión de semillas «viables»* (————), *«medio viables»* (— · — · —) *y «no viables»* (.....), *tres días sembradas.*

estudio de los perfiles electroforéticos de las fracciones proteicas albuminoidea y globulínica en los dos componentes fundamentales, endospermo y embrión, de semillas controles o «viables» (0 días de tratamiento, 95 ± 5 % de capacidad germinativa), «medio viables» (14 días de tratamiento, 34 ± 7,6 % capacidad germinativa) y «no viables» (28 días de tratamiento, 0 % capacidad germinativa). A su vez, dichos estudios se realizaron en semillas en estado seco y en semillas sembradas tres días, en condiciones similares a las descritas para las pruebas germinativas, es decir, en un estado pre-germinativo de imbibición.

De los perfiles electroforéticos de la fracción de albúminas de embrión en estado seco (fig. 1), debe resaltarse en primer lugar, cómo a medida que se incrementa la duración del tratamiento, pérdida de vitalidad, van desapareciendo algunas de las fracciones que migraban hacia el ánodo (bandas con m. e. 0,59, 0,48, 0,38, 0,29), compuestos con mayor carga negativa, menor peso molecular o interacción de ambas propiedades. Por otro lado, se observa la aparición de compuestos que se desplazan en sentido contrario, concretamente en embriones «medio viables» aparece una fracción bien delimitada de m. e. -0,35, mientras que en las «no viables» existe una mayor heterogeneidad proteica, comprendida en bandas de m. e. -0,14, -0,35, -0,46 y -0,51.

En las fracciones de albúminas embrionarias procedentes de semillas tres días sembradas (fig. 2) no se detectaron en los controles los compuestos con mayor movilidad electroforética que se habían observado en el estado seco (m. e. 0,59, 0,48, 0,38). En los embriones «medio viables» parece existir una mayor heterogeneidad de compuestos que migran en ambos sentidos, ya que aparecen una serie de bandas relativamente poco delimitadas hacia el cátodo y una de gran amplitud hacia el ánodo, que podría suponer, en parte, una degradación de las fracciones observadas en los controles «viables» ha-

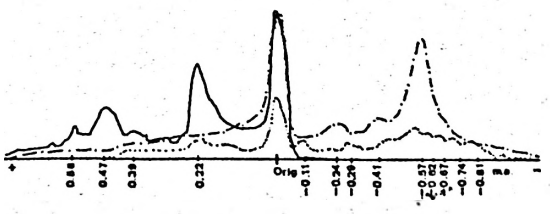

Fig. 3. *Efecto del envejecimiento artificial sobre la fracción albuminoidea de endospermo de semillas «viables»* (————), *«medio viables»* (— · — · —) *y «no viables»* (.....), *en estado seco.*

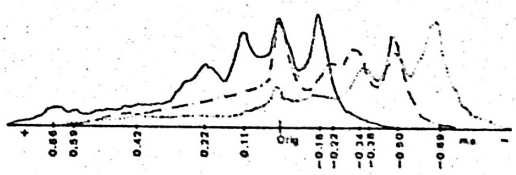

Fig. 4. *Efecto del envejecimiento artificial sobre la fracción albuminoidea de endospermo de semillas «viables»* (————), «medio viables» (— · — · —) *y «no viables* (.....), *tres días sembradas.*

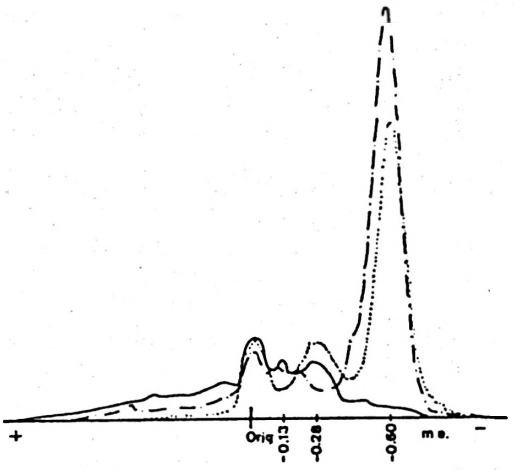

Fig. 5. *Efecto del envejecimiento artificial sobre la fracción globulínica de embrión de semillas «viables»* (————), *«medio viables»* (—·—·—) *y «no viables»* (.....), *en estado seco.*

cia formas de peso molecular menor. Este hecho parece ser un estado intermedio con lo observado en embriones «no viables», donde sólo aparecen indicios de proteínas hacia el polo positivo y permanece la dispersión de los compuestos que migran en sentido contrario, aunque con una fracción más destacada, la de m. e. -0,67.

Las variaciones en los resultados obtenidos con la fracción albuminoidea en endospermos secos y tres días sembrados (figs. 3 y 4) son similares a los anteriormente descritos para embriones. Sin embargo, debe resaltarse que las alteraciones provocadas por la pérdida de viabilidad son más marcadas en endospermos y tales cambios son ya detectados en el estado seco, observándose que la pérdida de capacidad germinativa conlleva la aparición de fracciones que emigran hacia el cátodo y el incremento de la dispersión proteica queda finalmente reflejada en una serie de bandas no bien delimitadas con m. e. comprendido entre -0,11 y -0,81 en endospermos «no viables».

El hecho de que los cambios a este nivel por efecto del envejecimiento artificial sean más patentes en endosperno que en embrión, podría ser debido a la propia estructura de la semilla de *Pinus pinea*, en la cual el embrión se encuentra envuelto y totalmente protegido por el endospermo.

Los perfiles electroforéticos para la fracción globulínica de embriones procedentes de semillas secas (fig. 5), muestran una clara movilidad de las fracciones hacia el cátodo, la cual se ve incrementada a medida que disminuye la capacidad germinativa de la semilla (bandas de m. e. -0,60 en embriones medio y no viables). Sería interesante señalar en este caso que, aunque cuantitativamente no se habían encontrado variaciones significativas en trabajos anteriores (12), en el aspecto cualitativo existen algunas diferencias importantes como se acaba de describir.

Una vez sometidas las semillas a tres días de siembra (fig. 6) en los perfiles electroforéticos de las fracciones globulínicas de embriones, se observó la desaparición de bandas intermedias, cuando se compara con los perfiles obtenidos en los embriones de semillas en estado seco, así por ejemplo la que aparecía con m. e. -0,13 de embriones secos viables o la de m. e. -0,28 en los no viables, mientras

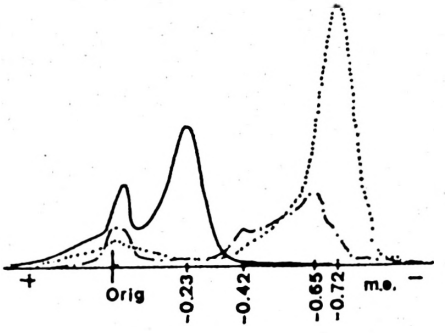

Fig. 6. *Efecto del envejecimiento artificial sobre la fracción globulínica de embrión de semillas «viables»* (————), *«medio viables»* (—·—·—) *y «no viables»* (.....), *tres días sembradas.*

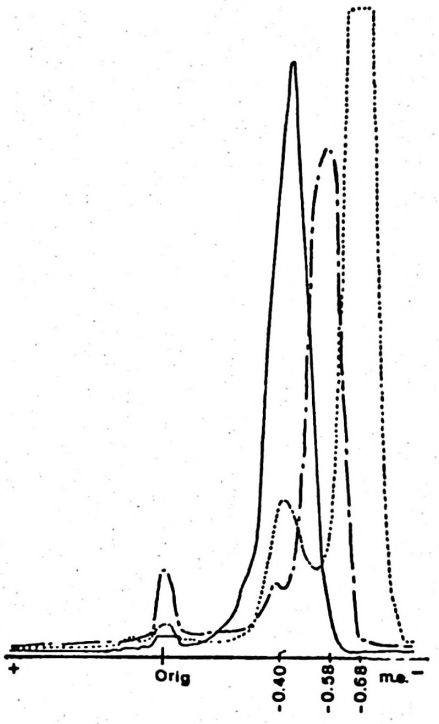

Fig. 7. *Efecto del envejecimiento artificial sobre la fracción globulínica de endospermo de semillas «viables» (————), «medio viables» (— · — · —) y «no viables» (.....), en estado seco.*

que, y al igual que en el estado seco, aparece un incremento de la movilidad hacia el polo negativo a medida que disminuye la viabilidad de la semilla siendo las bandas de mayor migración las de m. e. -0,65 en «medio viables» y de -0,72 en «no viables», frente a -0,23 para las viables.

La fracción globulínica de endospermos en estado seco (fig. 7) mostró un claro paralelismo con lo ya descrito para embriones en el mismo estado, si bien las bandas que aparecen en la electroforesis se encuentran más delimitadas. Sin embargo, a los tres días de siembra, el comportamiento de los endospermos (fig. 8) no parece ser semejante al de los embriones. En este caso, la puesta en marcha del proceso germinativo dio origen en los endospermos «viables» al desarrollo de un pico de gran movilidad hacia el polo negativo con m. e. -0,85 y a una amplia banda comprendida entre el origen y dicho pico, que hace pensar en una heterogeneidad globulínica, comportamiento que no se refleja en los endospermos «medio viables» y «no viables», en los cuales la pérdida de capacidad germinativa se ve acompañada de una menor migración de fracciones hacia el cátodo, siendo en estos casos las bandas de mayor movilidad electroforética las de m. e. -0,66 y -0,63 para «medio viables» y «no viables» respectivamente, observándose además una ausencia de la banda intermedia, especialmente en endospermos «no viables».

Como resumen de estos estudios, se podría indicar que los perfiles electrofo-

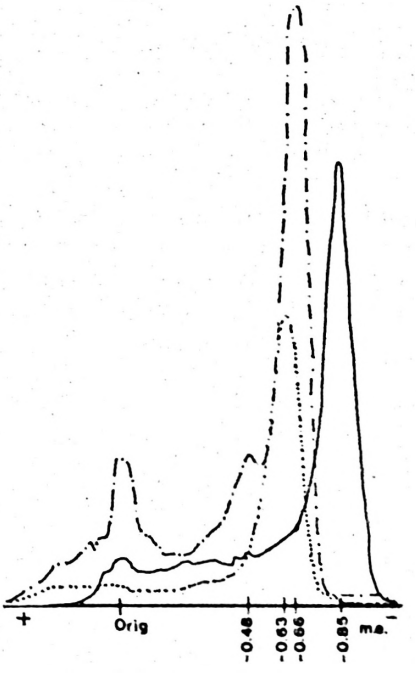

Fig. 8. *Efecto del envejecimiento artificial sobre la fracción globulínica de endospermo de semillas «viables» (————), «medio viables» (— · — · —) y «no viables» (.....), tres días sembradas.*

réticos de semillas con viabilidad disminuida frente a sus controles son drásticamente diferentes, incluso cuando a nivel cuantitativo no se apreciaron variaciones significativas (11). Esta variación en el comportamiento electroforético puede ser debida a diferencias en la carga, en el peso molecular o interacción de ambas propiedades.

Los resultados obtenidos parecen concordar con los encontrados por GRZESIUK y KULKA (13), quienes comprobaron la existencia de cambios en el peso molecular de los componentes de la fracción de albúminas en semillas de avena, por efecto de envejecimiento natural. Por otro lado, también GILLESPIE *et al.* (10), en semillas de *Lupinus angustifolius* y RANDALL *et al.* (17), en semillas de *Pisum sativum* observaron cómo los factores ambientales producían cambios en la composición de las subunidades de proteínas de reserva. Nuestros resultados podrían apuntar también en este sentido, ya que anteriormente se había comprobado que las semillas de *Pinus pinea* envejecidas artificialmente y sembradas tres días (embrión y endospermo), poseían una actividad proteásica más elevada que sus respectivos controles (11). Por otro lado, durante el envejecimiento y la germinación de las semillas envejecidas existe una degradación de los ácidos nucleicos hacia formas de peso molecular menor y una falta de agregación de ribosomas y formación de polisomas en las primeras etapas de germinación (8), datos que estarían de acuerdo con los reseñados por otros autores en embriones de cebada envejecida artificialmente (14), en semillas de centeno (15) y en embriones de guisante envejecidos natural y artificialmente (4, 5). Los descensos en los niveles de ATP durante el proceso de envejecimiento (pendiente de publicación), repercuten asimismo alterando aquellas reacciones metabólicas en las que es utilizado, efecto ya señalado por diversos autores (2, 6, 20).

Resumen

Se estudian las alteraciones, en los perfiles electroforéticos de las fracciones albuminoidea y globulínica de endospermo y embrión de semillas de *Pinus pinea*, producidas por la pérdida de capacidad germinativa inducida por un proceso de envejecimiento artificial. Los resultados obtenidos muestran que los perfiles electroforéticos de semillas envejecidas son drásticamente diferentes a los de semillas controles, es decir, aquellas con alta capacidad germinativa, incluso cuando a nivel cuantitativo no se habían apreciado variaciones significativas.

Bibliografía

1. ABDUL-BAKI, A. A.: *Hort. Sci.*, **15**, 765-771, 1980.
2. BANERJEE, A., CHOUDHURI, M. M. y GHOSH, B.: *Z. Pflanzenphysiol.*, **102**, S, 33-36, 1981.
3. BLOWERS, L. E., STORMONTH, D. A. y BRAY, C. M.: *Planta*, **150**, 19-25, 1980.
4. BRAY, C. M. y CHOW, T-Y.: *Biochem. Biophys. Acta*, **442**, 1-13, 1976.
5. BRAY, C. M. y CHOW, T-Y: *Biochem. Biophys. Acta*, **442**, 14-23, 1976.
6. CHING, T. M.: *Plant Physiol.*, **51**, 400-402, 1973.
7. DICKSON, M. H.: *Hort. Sci.*, **15**, 771-774, 1980.
8. FERNÁNDEZ-GARCÍA DE CASTRO, M.: Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid, 1978.
9. FERNÁNDEZ-GARCÍA DE CASTRO M. y MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C. J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **38**, 13-20, 1982.
10. GILLESPIE, J. M., BLAGROVE, R. J. y RANDALL, P. J.: *Aust. J. Physiol.*, **5**, 641-650, 1978.
11. GONZÁLEZ-JULIÁ, B. MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C. J. y FERNÁNDEZ-GARCÍA DE CASTRO, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, **38**, supl., 307-314, 1982.
12. GONZÁLEZ-JULIÁ, B.: Tesina, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid, 1982.
13. GRZESIUK, S. y KULKA, K.: *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.*, **19**, 435-440, 1971.
14. ONCKELEN, H. A. VAN, VERBEEK, R., STONE, M. A. y KHAN, A. A.: *Plant Physiol.*, **51**, Suplemento, 39, 1973.
15. OSBORNE, D. J., ROBERTS, B. E., PAYNE, P. I. y SEN, S.: Mechanism of Regulation of Plant Growth, Bulletin, **12**, 805. The Royal Society of New Zealand, Wellington, N. Z., 1974.
16. OSBORNE, D. J.: En «Senescence Plants» (Thimann, K. V. ed.). CRC, Boca Raton, Florida, 1980, pp. 13-37.

17. RANDALL, P. J., THOMSON, J. A. y SCHROEDER, H. E.: *Aust. J. Plant Physiol.*, 6, 11-24, 1979.
18. ROBERTS, B. E. y OSBORNE, D. J.: En «Seed Ecology» (Heydecker, W. ed.) Butterworths. Londres, 1973, pp. 99-114.
19. ROOS, E. E.: *Hort. Sci.*, 15, 781-784, 1980.
20. STYER, R. C., CANTLIFFE, D. J. y HALL, C. B.: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 105, 298-303, 1980.
21. VILLIERS, T. A.: En «Seed Ecology» (Heydecker, W. ed.) Butterworths, Londres, 1973, pp. 265-288.