

Laboratorio de Fisiología Vegetal
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona

Contenido de ácido nucleico y viabilidad en las semillas del trigo *

por

M. Serrano y C. Morales

(Recibido para publicar el 10 de octubre de 1967)

En semillas de trigo de la misma cosecha y del mismo peso hemos observado dos hechos susceptibles de relacionar entre sí: distintos grados de capacidad germinativa y una gran diversidad en los valores de DNA y RNA, particularmente del primero, que contienen en estado de reposo. El procedimiento idóneo para comprobar esta relación sería el análisis del DNA y RNA y la prueba de capacidad germinativa en la misma semilla. Como esto no es posible, hemos tenido que recurrir a procedimientos indirectos, obteniendo con ellos resultados valora- bles para la confirmación de nuestra hipótesis. Las experiencias realizadas con las semillas estudiadas han consistido, fundamentalmente, en el ensayo de su capacidad germinativa y en la determinación del DNA y RNA que contienen: a) en estado de reposo, b) en el embrión y en el endospermo de las germinadas y c) en las que carecen de capacidad germinativa.

Algunos de los aspectos considerados en este trabajo, particularmente el que concierne al curso seguido por el DNA

y RNA en los tejidos embrionarios y en los de reserva de la semilla, durante la germinación, han sido estudiados en distintas especies por varios investigadores (1, 3, 5, 17, 20, 21). Desde el estado de imbibición y durante la germinación propiamente dicha de la semilla aumenta el contenido de ácido nucleico en sus tejidos embrionarios. Así ha sido averiguado en semillas de diferentes especies. BELOZERSKII y ASEVA (3), INGLE y col. (14) e INGLE y HAGEMAN (15) refieren este aumento a ácido nucleico; BEEVERS y GUERNSEY (2) a DNA y RNA; HOLDGATE y GOODWIN (13) a DNA, y CHERRY y HAGEMAN (10), CHERRY y col. (11, 12), LEDOUX y col. (16), OOTA y OSAWA (20), y OOTA y TAKATA (21) a RNA. Este aumento ha sido atribuido a una translocación desde los tejidos de reserva (1, 2, 10, 11, 12, 13, 16, 20, 21) o a una síntesis *de novo* en el mismo tejido embrio-

(*) Este trabajo ha sido realizado con ayuda del F.I.U., del Ministerio de Educación y Ciencia.

nario (2, 3, 13, 14, 15, 16). También ha sido admitido que ambos procesos se verifiquen simultáneamente o en estrecha sucesión (2, 13, 16). En los tejidos de reserva se produce, durante la germinación de la semilla, una disminución en el contenido de ácido nucleico. Así ha sido observado para DNA en el escutelo (13) y en el endospermo (14) de maíz, y para RNA en los cotiledones de guisante (2), en el escutelo de maíz (10, 11, 12) y en el endospermo de centeno (13, 14). Esta disminución frecuentemente va precedida de un aumento, según ha sido demostrado para DNA en los cotiledones de guisante (2) y en los de cacahuete (6), en el escutelo de maíz (14) y en el endospermo de centeno (13), y para RNA en los cotiledones de cacahuete (5, 6, 7, 8), y en el escutelo (5, 9) y endospermo (14) de maíz.

Material y métodos

Este trabajo ha sido verificado con semillas de trigo (*Triticum vulgare* L.) de la última cosecha, teniendo así una relativa certeza de que los sistemas enzimáticos se encuentran en ellas activos y, por consiguiente, de que la viabilidad de las semillas tendría que depender de otras sustancias, entre las que el DNA y RNA ocupan sin duda una posición preferente.

Las semillas, previamente lavadas con agua destilada hervida, se sembraron en lecho de arena silíceo humedecida con agua destilada o con solución de DNA al 0,04 %, contenida en cápsulas de Petri. Las cápsulas se pusieron en una estufa de germinación de $20 \pm 1^\circ$, en luz natural.

Diariamente se contaron las semillas germinadas y no germinadas, y se verificaron los análisis de DNA y RNA en el embrión y en el endospermo de las semillas germinadas y de la semilla total en las no germinadas. También se analizó un elevado número de semillas en reposo.

Para la extracción del DNA y RNA adoptamos el método de MAYER y POLJAKOFF-MAYBER (18): cada semilla, plántula, embrión o endospermo es homogeneizado, en un mortero de vidrio, con 4 ml de ácido tricloroacético 1 M; con otros 2 ml se pasa el homogeneizado a un tubo de centrifuga, y éste a un frigorífico a 2° , durante 24 horas. Se centrifuga y se decanta el líquido sobrenadante. El residuo se lava dos veces con 2 ml de alcohol etílico de 70 %, se centrifuga y se decanta el líquido sobrenadante después de cada lavado. En la misma forma se verifican lavados sucesivos con ácido perclórico 0,1 N y alcohol etílico de 70 %, en la proporción de 1:1, con alcohol etílico y éter en la de 2:1, y ácido perclórico 0,2 N. El residuo se extrae dos veces con 2,5 ml de ácido perclórico, durante media hora cada vez, en baño de María a 70° . Se combinan los extractos.

Para la determinación del DNA se ponen en un tubo de ensayo 1 ml del extracto y 2 ml del reactivo de difenilamina preparado según SCHNEIDER, modifi-

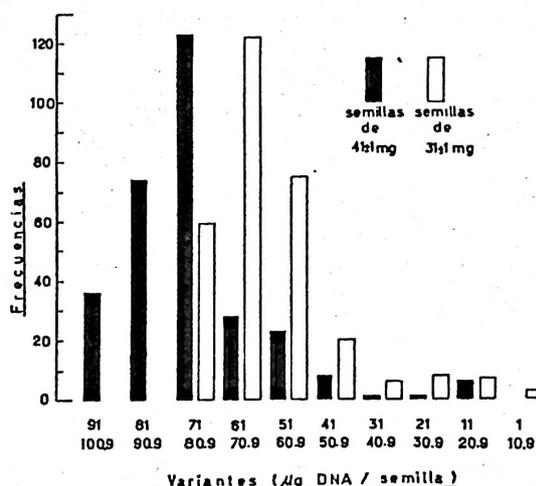


FIG. 1. Contenido de DNA de las semillas en reposo. Histograma correspondiente a 600 semillas, 300 de 41 ± 1 y 300 de 31 ± 1 mg de peso

cación de BURTON (*) (4); se tapa el tubo y se deja en la estufa a 37° durante 20 horas. Las lecturas se han efectuado en un espectrofotómetro Zeiss PMQIII, en la longitud de onda de 600 mμ. Como testigo se utiliza la mezcla de 1 ml de ácido perclórico 2 N y 2 ml del reactivo de difenilamina.

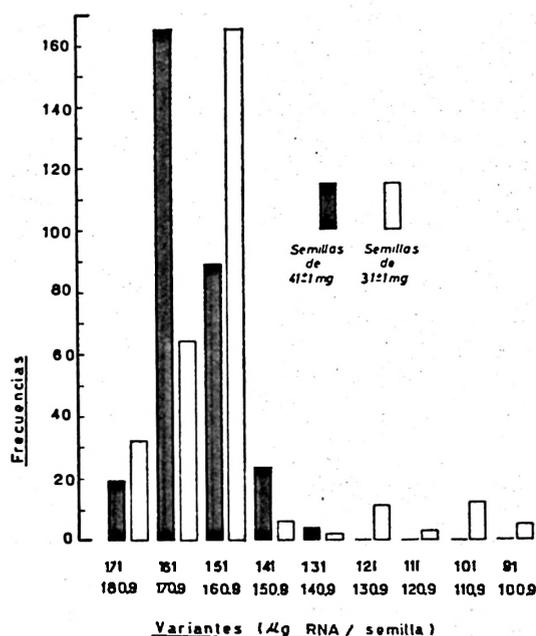


FIG. 2. Contenido de RNA de las semillas en reposo. Histograma correspondiente a 600 semillas, 300 de 41 ± 1 y 300 de 31 ± 1 mg de peso de peso

El RNA se ha determinado por diferencia entre el contenido de ácido nucleico total y el de DNA. La determinación del ácido nucleico total se ha efectuado directamente en el líquido de extracción, en el mismo espectrofotómetro Zeiss PMQIII, en la longitud de onda de 260 mμ, según OGUR y ROSEN (19).

(*) 1,5 g de difenilamina disuelta en 100 ml de ácido acético glacial y 1,5 ml de ácido sulfúrico concentrado; manténgase en la oscuridad.

Resultados

ENSAYO DE LA CAPACIDAD GERMINATIVA. Las semillas de trigo ensayadas manifestaban tres grados fundamentales de capacidad germinativa: a) germinaban el primero o segundo día de sembradas — desarrollaban plántulas normales; b) germinaban a partir del tercer día de sembradas — no pasaban de un estado de crecimiento o de germinación incipiente, y c) no germinaban (tabla I).

CONTENIDO DE DNA Y RNA EN LAS SEMILLAS EN REPOSO. Mediante el análisis individual de 600 semillas: 300 de 41 ± 1 y 300 de 31 ± 1 mg de peso (figuras 1 y 2), hemos podido averiguar que, a pesar de la homogeneidad de la muestra (semillas de la misma cosecha y del mismo peso), los valores de DNA y RNA fluctuaban en ellas dentro de límites muy amplios (tabla II). Otros hechos que se desprendían del análisis eran que los valores de DNA y RNA frecuentemente no se correspondían en magnitud, pudiendo la misma semilla contener un alto nivel de DNA y uno bajo de RNA, y viceversa, y que la diferencia entre los valores extremos de DNA era mucho mayor que entre los de RNA (tabla II).

CONTENIDO DE DNA Y RNA EN EL EMBRIÓN Y EN EL ENDOSPERMO EL DÍA EN QUE SE PRODUCÍA LA GERMINACIÓN. Los contenidos de DNA y RNA en el embrión y en el endospermo eran tanto más

Tabla I

Capacidad germinativa de las semillas

Día en que germinan	Porcentaje de semillas germinadas		Curso de crecimiento de las plántulas
	41 ± 1 mg	31 ± 1 mg	
1	80,0	72,5	Normal
2	12,0	10,0	id.
3	1,5	7,5	crecimiento incipiente
4	0,5	3,0	germinación incipiente
5	0,5	1,0	id.
6	0,5	1,0	id.
7	0,0	0,0	—
No germinan	5,0	5,0	—

Tabla II

Valores extremos de DNA y RNA y diferencias entre ellos, expresados en μg por semilla en estado de reposo y en porcentaje de peso

Semillas de	μg de DNA ó RNA por semilla							
	Valores de DNA				Valores de RNA			
	Mín alto	Mín bajo	Diferencia	Diferencia %	Mín alto	Mín bajo	Diferencia	Diferencia %
4123 mg	96	17	79	82	174	136	38	22
3121 mg	79	8	71	90	181	102	79	44

bajos cuanto mayor era el tiempo que tardaba en producirse la germinación (figura 3).

CURSO SEGUIDO POR EL DNA Y RNA EN EL EMBRIÓN Y EN EL ENDOSPERMO A PARTIR DEL DÍA EN QUE SE PRODUCÍA LA GERMINACIÓN. En los embriones que germinaban dentro de los dos primeros días de sembradas las semillas, el crecimiento y el DNA y RNA seguían un curso ascendente (figs. 4 A y B, y 5 A y B). En los que germinaban el tercer día el crecimiento no pasaba de un estado incipiente y el DNA y RNA, después de un ligero aumento inicial, seguían un curso descendente (figs. 4 C y 5 C). Los que germinaban a partir del cuarto día no pasaban de un estado de germinación incipiente; el DNA y RNA seguían en ellos, desde el principio, un curso descendente (figs. 4 D y 5 D).

En el endospermo de las semillas que germinaban el primero, segundo y tercer día de sembradas, el contenido de DNA y RNA, salvo alguna excepción, aumentaba o permanecía estacionario inicialmente, es decir, durante el período de inhibición y estados tempranos de la germinación propiamente dicha, disminuyendo después (figs. 4 A, B y C, y 5 A, B y C). El que se observara un aumento o una disminución podía depender, por consiguiente, de la frecuencia con que se tomaban las primeras muestras para el análisis. Si se tomaban a intervalos cortos (de horas) las prime-

ras muestras, era más probable observar un aumento de DNA y RNA que si los intervalos eran mayores (de días), cuando la germinación se había manifestado francamente, en cuyo caso pudiera haberse producido una migración de ácidos nucleicos desde el endospermo al embrión, o simplemente una degradación de ellos en el endospermo mismo. Así ha sido averiguado por otros investigadores y por nosotros mismos. En el endospermo de las semillas que germinaban el cuarto día de sembradas, por el contrario, se observaban desde el principio una acusada disminución en los contenidos de DNA y RNA (figs. 4 D y 5 D).

CURSO SEGUIDO POR EL DNA Y RNA EN LAS SEMILLAS NO GERMINADAS. En estas semillas, tomadas del mismo lecho de siembra que las germinadas, y por ello expuestas a idénticas condiciones, se producía una disminución progresiva en su contenido de DNA y RNA, algo más acusada del segundo al tercer día de sembradas que en el resto del curso (figs. 4 E y 5 E).

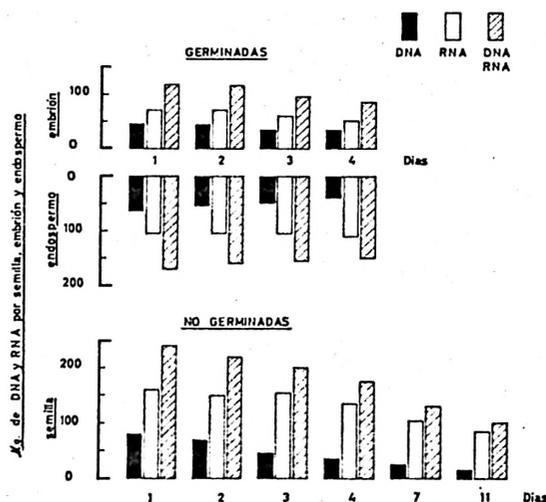


FIG. 3. Contenido de DNA y RNA en el embrión y en el endospermo de las semillas el día en que inician la germinación; y en las no germinadas del mismo lecho de siembra, y por ello expuestas a idénticas condiciones. Cada valor representa el promedio de 10 análisis.

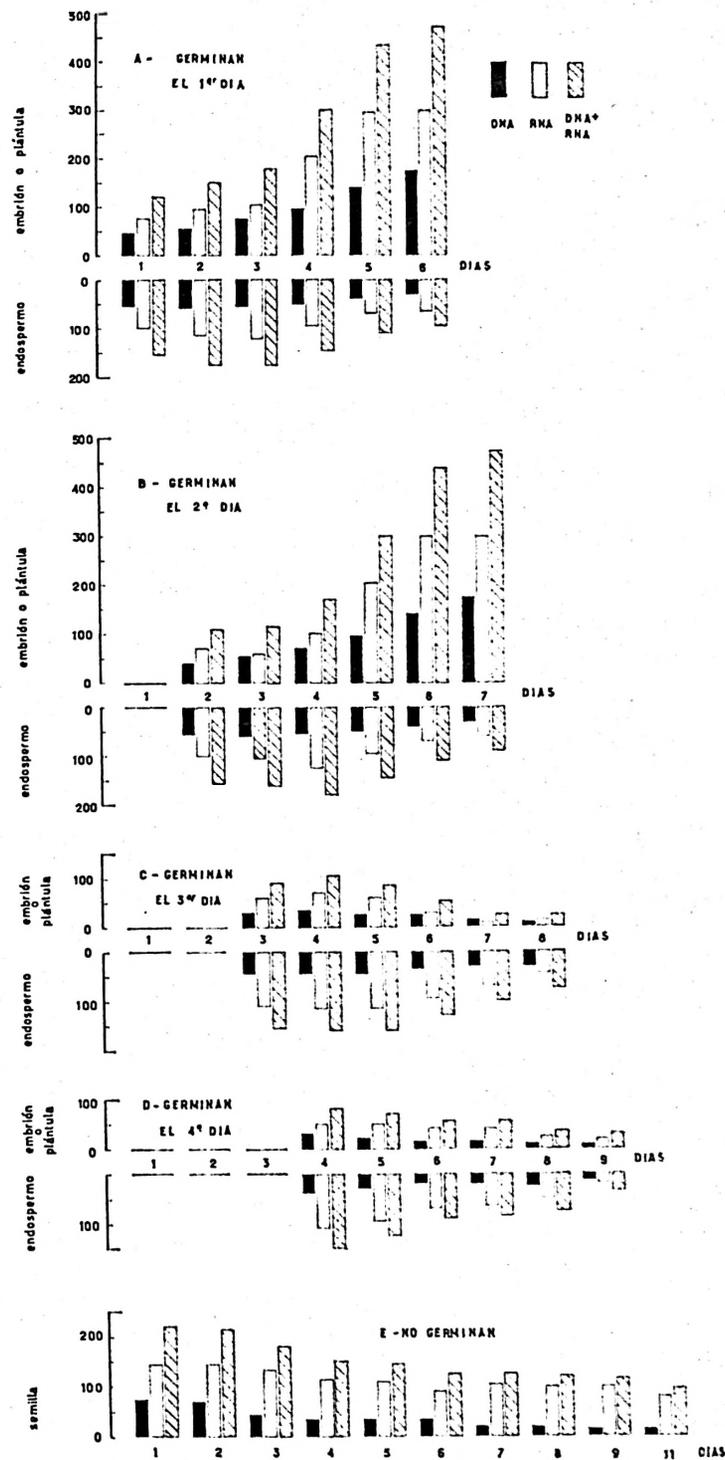


FIG. 4. Curso seguido por el DNA y RNA en el embrión o en la plántula y en el endospermo de semillas de 41 ± 1 mg de peso, a partir del día en que inician la germinación; y en las no germinadas del mismo lecho de siembra, es decir, expuestas a idénticas condiciones. Cada valor representa el promedio de 10 análisis.

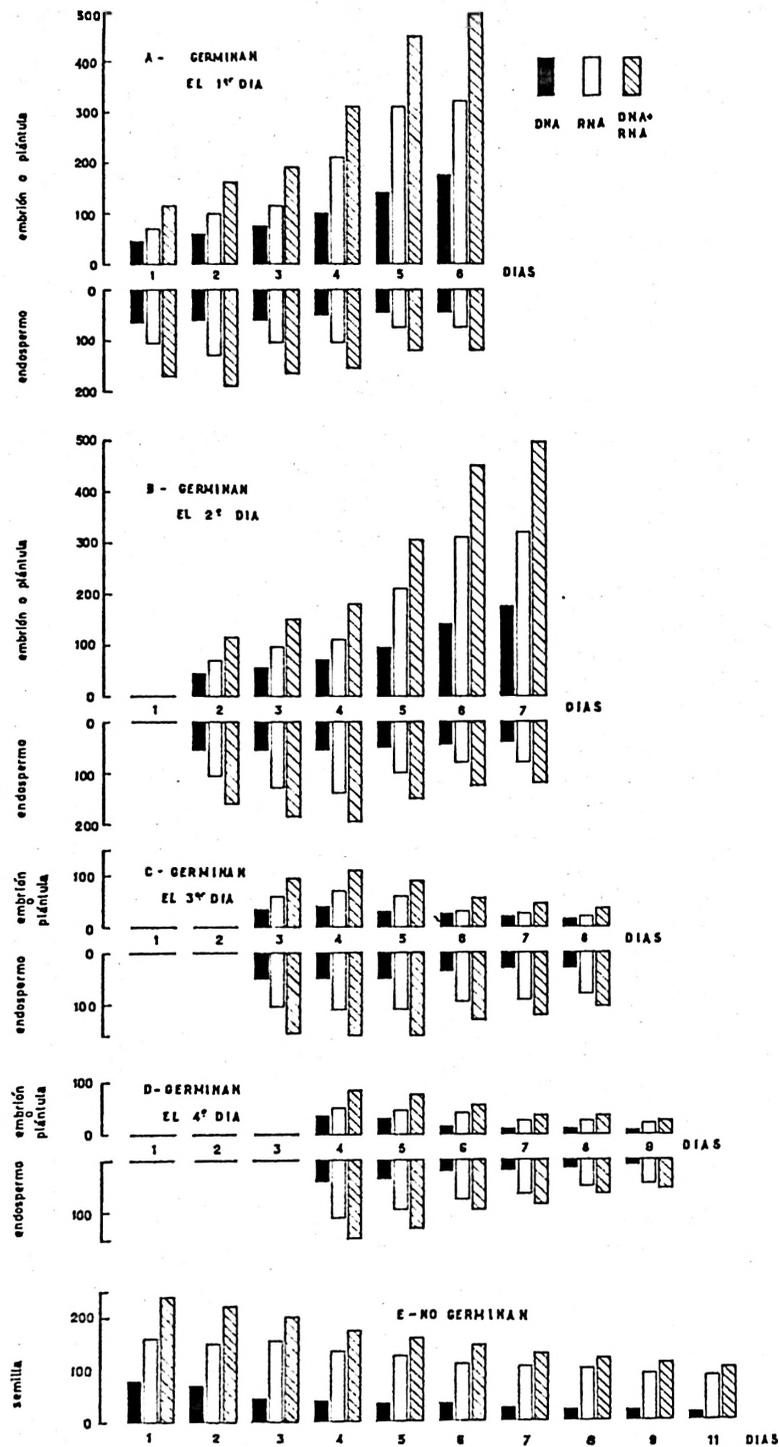


FIG. 5. Curso seguido por el DNA y RNA en el embrión o en la plántula y en el endospermo de semillas de 31 ± 1 mg de peso, a partir del día en que inician la germinación; y en las no germinadas del mismo lecho de siembra, es decir, expuestas a idénticas condiciones. Cada valor representa el promedio de 10 análisis.

ESTÍMULO DE LA CAPACIDAD GERMINATIVA DE LAS SEMILLAS PEREZOSAS PARA LA GERMINACIÓN MEDIANTE LA ADICIÓN DE DNA. Una prueba directa de la significación del DNA para la viabilidad de las semillas la hemos obtenido mediante los siguientes ensayos: a) Se sembraron, sucesivamente, en lechos independientes, humedecidos con solución de DNA al 0,04 %, las semillas que iban germinando a partir del tercer día de sembradas. Solamente los embriones germinados el tercer día respondían al tratamiento, tomando en ellos el crecimiento y el DNA y RNA un curso ascendente normal, pero no en los que germinaban después. En estos últimos se paralizaba el crecimiento en un estado incipiente y el DNA y RNA seguían un curso descendente, como en aquéllos de las semillas que habían proseguido en el lecho humedecido con agua. b) En una siembra efectuada desde el comienzo sobre lecho humedecido con solución de DNA al 0,04 % se observó que todos los embriones continuaban creciendo y que el DNA y RNA seguían un curso ascendente, como en aquéllos que habían germinado el primero y segundo día.

Aunque los resultados de estos ensayos son inequívocos, no adelantamos datos numéricos o gráficos de ellos por ser motivo en la actualidad de un estudio más detenido y completo.

Discusión

En las semillas de trigo ensayadas hemos comprobado la existencia de una relación entre el grado de viabilidad que manifiestan y sus niveles de DNA y RNA.

El elevado contenido de DNA y RNA de los embriones germinados el primero y segundo día de sembradas las semillas, y el curso ulterior, marcadamente ascendente, seguido por el crecimiento de las plántulas y por los indicados ácidos nucleicos (figs. 4 A y B, 5 A y B), sería

debido, según nuestra hipótesis, al alto nivel de DNA y RNA, particularmente del primero, que contenían los embriones (o las semillas) en estado de reposo. El aumento de DNA y RNA observado en estos embriones, durante el período de imbibición y comienzo de la germinación propiamente dicha, tenía que haberse producido, en parte por los menos, *de novo*, y no únicamente por translocación desde los tejidos de reserva. A esta conclusión se llegaba debido a que durante el mismo tiempo los indicados ácidos nucleicos permanecían estables, o incluso aumentaban ligeramente, en el endospermo (figs. 4 A y B, y 5 A y B).

Los embriones que germinaban a partir del tercer día de sembradas las semillas (figs. 4 C y D, y 5 C y D) ocupaban una posición intermedia entre los activamente germinantes y los que carecían de capacidad germinativa. Es difícil decidir si en estos embriones, hasta que iniciaban la germinación, se estaba produciendo una degradación o una síntesis de DNA y RNA. Si se producía una degradación, como la observada en las semillas que carecían enteramente de capacidad germinativa (figs. 4 E y 5 E), el bajo nivel de DNA y RNA en ellos no sería la causa sino la consecuencia de su falta de viabilidad. Si, por el contrario, era una síntesis lo que se producía, como en los que germinaban durante los dos primeros días de sembradas las semillas (figs. 4 A y B, y 5 A y B), sería solamente hasta que alcanzaban un estado de crecimiento o de germinación incipientes, puesto que después el DNA y RNA disminuían en ellos de manera progresiva. El curso descendente seguido en estos embriones por el DNA y RNA y la débil capacidad germinativa que manifestaban podrían ser debidos, según nuestra hipótesis, al bajo contenido de los indicados ácidos nucleicos, o de los precursores necesarios para producirlos, que contenían los embriones (o las semillas) en estado de reposo. En cualquier

caso, el resultado sería la falta de las moléculas de DNA y RNA necesarias para la multiplicación y el crecimiento celular.

Una prueba de la significación del DNA y RNA, particularmente del primero, para la viabilidad de las semillas, la hemos obtenido adicionando DNA en el lecho de siembra. Los embriones perezosos eran estimulados a crecer y el curso seguido por el DNA y RNA cambiaba de descendente en ascendente.

El comportamiento de los embriones perezosos de las semillas embebidas con la solución de DNA era igual al de aquellos que en estado de reposo, y de manera natural, disponían de una mayor cantidad del indicado ácido nucleico. Este ensayo nos permitía deducir que la limitación de la viabilidad de los embriones a un estado de crecimiento o de germinación incipientes, podría ser debido al bajo contenido de DNA de que disponían en estado de reposo.

Los hechos observados nos han inducido a admitir que para la viabilidad de los embriones no puede ser indiferente la diversidad de valores de DNA que contenían las semillas en estado de reposo (fig. 1). Si se ordenan de mayor a menor estos valores de DNA de las semillas en reposo, y se separa un número de ellos equivalente al de germinaciones producidas dentro de los dos primeros días, el límite correspondería a $54 \mu\text{g}$ de DNA por semilla, lo mismo para las de 41 ± 1 que para las de 31 ± 1 mg de peso. Esta cantidad constituiría el «nivel crítico» para la viabilidad de los embriones de las semillas de trigo ensayadas. La viabilidad de estos embriones sería tanto mayor o tanto menor, respectivamente, cuanto más alta o más baja fuese la cantidad de DNA, a partir de la indicada como limitante. Aunque son muchísimos los grados de viabilidad que pueden darse en los embriones, existen dos relativamente bien definidos: el de aquellos que poseen capacidad para ger-

minar y crecer y el de los que carecen de alguna de estas capacidades.

Resumen

El grado de viabilidad de las semillas de trigo ensayadas se manifiesta: a) por su capacidad para germinar poco tiempo después de sembradas, b) por el notable incremento de DNA y RNA en los tejidos embrionarios al producirse la germinación, y c) por el curso ascendente seguido por el crecimiento y por el DNA y RNA en las plantas embrionarias. Todos estos rasgos se manifiestan tanto más acusadamente cuanto mayor es el nivel de DNA y RNA, particularmente el primero, en las semillas en reposo.

Se podría admitir la existencia de un «nivel crítico» de DNA en los embriones en reposo. Este nivel ha sido referido a semilla total, debido a las dificultades que presenta la separación del embrión y el endospermo en las semillas en reposo, y a causa de la posible influencia del endospermo sobre el embrión. El «nivel crítico» para las semillas de trigo de cosecha reciente ensayadas sería de $54 \mu\text{g}$ por semilla.

El DNA y RNA aumentan en los embriones con alto grado de viabilidad durante la germinación en una proporción mucho mayor que aquella en que disminuye en el endospermo, lo que indica que en los tejidos embrionarios se produce una síntesis *de novo*, independientemente de que se verifique o no una migración hacia ellos desde los tejidos de reserva. El DNA y RNA disminuyen notablemente en los embriones no viables como cualquier otra sustancia de reserva.

Summary

Nucleic acid content and viability of the wheat seeds

The viability of the wheat embryos is evidenced by: a) their capacity for germinating in a short time and to develop normal plantules, b) the notable increase undergone by the DNA and the RNA during the germination, and c) the ascending course followed by the DNA and the RNA in the plantules. All these features are manifested the more conspi-

cuously, the higher the level of the DNA and RNA in the seeds in repose.

It could admit the existence of a viability critical DNA level in the embryos in a state of rest. This level has been referred to the seed as a whole, in view of the difficulties attendant on the separation of the embryo and the endosperm when the seed is in repose; moreover, in view of the influence that might be exercised by the endosperm on embryonal germination. In wheat seed of recent crop this critical level we have found to be 54 μ g per seed.

The DNA and the RNA of high viability degree embryos increase during germination, in very much higher proportion to their diminution in the endosperm, thus indicating an independent synthetic formation in the former, apart from and in addition to that which migrates from the latter. The DNA and the RNA notably diminish in non-viable embryos, as does any other reserve substance.

Bibliografía

1. BARKER, G. R. and DOUGLAS, T. : *Nature*, **188**, 943, 1960.
2. BEEVERS, L. and GUERNSEY, F. S. : *Plant Physiol.*, **41**, 1455, 1966.
3. BELOZERSKII, A. N. and ASEVA, I. V. : *Biokhimiya zerna* (Biochemistry of Grain) Akad Nauk SSSR : Moscow, **4**, 22, 1958. Ref. : *Zhur, Biol.*, n.º 66382, 1959.
4. BURTON, K. : *Biochem. J.*, **62**, 315, 1956.
5. CHERRY, J. H. : *Biochem. Biophys. Acta*, **68**, 193, 1963.
6. CHERRY, J. H. : *Plant Physiol.*, **38**, 440, 1963.
7. CHERRY, J. H. : *Science*, **146**, 1066, 1964.
8. CHERRY, J. H., CHROBOZEK, H. and CARPENTER, W. J. G. : *Plant Physiol.*, **40**, 582, 1965.
9. CHERRY, J. H. and HAGEMAN, R. H. : *Plant Physiol.*, **35**, 343, 1960.
10. CHERRY, J. H. and HAGEMAN, R. H. : *Plant Physiol.*, **36**, 163, 1961.
11. CHERRY, J. H., HAGEMAN, R. H. and HANSON, J. B. : *Radiation Res.*, **17**, 724, 1962.
12. CHERRY, J. H., HAGEMAN, R. H., RUTGER, J. N. and JONES, J. B. : *Crop Sci.*, **1**, 133, 1961.
13. HOLDGATE, D. P. and GOODWIN, T. W. : *Phytochemistry*, **4**, 845, 1965.
14. INGLE, J., BEEVERS, L. and HAGEMAN, R. H. : *Plant Physiol.*, **39**, 735, 1964.
15. INGLE, J. and HAGEMAN, R. H. : *Plant Physiol.*, **40**, 48, 1965.
16. LEDOUX, L., GALAND, P. and HUART, R. : *Exptl. Cell Res.*, **27**, 132, 1962.
17. MARCUS, A. and FEELEY, J. : *Biochem. Biophys. Acta*, **61**, 830, 1962.
18. MAYER, A. M. and POLJAKOFF-MAYBER, A. : *Physiologia Plantarum*, **15**, 283, 1962.
19. OGUR, M. and ROSEN, G. : *Arch. Biochem*, **25**, 262, 1950.
20. OOTA, Y. and OSAWA, S. : *Experientia*, **10**, 254, 1954.
21. OOTA, Y. and TAKATA, K. : *Advances in Botany*, University of Toronto Press, Toronto, **2**, 1059, 1961.

