

Cambios bioquímicos en semillas de *Pinus pinea* I. Pretratamientos con altas temperaturas

C. J. Martínez-Honduvilla, A. Giménez-Solves y A. Santos-Ruiz

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Madrid - 3

(Recibido el 4 de abril de 1974)

C. J. MARTINEZ-HONDUVILLA, A. GIMENEZ-SOLVES and A. SANTOS-RUIZ. *Biochemical Changes in Pinus pinea Seeds. I. Pretreatments by High Temperatures*. Rev. esp. Fisiol., 30, 177-182. 1974.

The metabolism of *Pinus pinea* is studied in order to find any possible correlation between germination promotion and metabolic changes in seeds, by effect of high temperature.

In our experiments, it is possible to distinguish changes in the levels of lipids, carbohydrates, proteins and aminoacids by effect of the treatment. The increase in the nucleic acids is slight. Isocitrate lyase and malate dehydrogenase activities showed no significative difference with controls.

La investigación de las causas que determinan el estado durmiente en semillas ha sido objeto de numerosos trabajos. Los resultados obtenidos en este campo suponen un aporte al conocimiento de los procesos germinativos y una posible aplicación de tipo práctico, al permitir disponer de procedimientos capaces de mejorar la rentabilidad de semillas. Una de las líneas de trabajo seguidas con este fin ha sido el ensayo de tratamientos capaces de acelerar la ruptura del estado durmiente, relacionando los efectos fisiológicos, observados a través de su comportamiento germinativo, con los cambios estudiados a nivel molecular, especialmente en principios inmediatos, ácidos nucleicos y actividades enzimáticas. Uno de los me-

yor conocidos es el de estratificación por frío (14-16).

Existen varios tipos de semillas que mejoran su poder de germinación al ser sometidas a un tratamiento por calor (1, 13, 18, 19). En nuestro laboratorio, MARTÍNEZ-HONDUVILLA (9) ha podido comprobar una influencia semejante en semillas de *P. pinea*, mediante temperaturas comprendidas entre 40 y 80° C durante períodos de tiempo variables. En el presente trabajo se describen los cambios a nivel metabólico provocados por la acción del calor en dicha especie. Se ha estudiado, tanto en semilla completa como en embrión y endospermo, por separado, los niveles de humedad, lípidos totales, proteínas solubles, aminoácidos libres, glúcidos

reductores, ácidos nucleicos totales y proteínas enzimáticas específicas, tales como la isocitratoliasa del ciclo glioxílico y la malatodeshidrogenasa — común al ciclo tricarbóxico y glioxílico — con discusión de su posible significado en la ruptura del estado durmiente.

Material y métodos

El material empleado ha sido semillas de *P. pinea*, suministradas por el Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Se ha trabajado con dos tipos de semillas, el primero procedente de lugares fríos de Coca y Cuéllar (Segovia), y el segundo, de cálidos, con muestras recolectadas en la provincia de Huelva. La edad de las semillas ha variado entre uno y tres años, con capacidad germinativa en todos los casos de un 95 %.

Las semillas se sometieron a 47° C durante tres días. Los lípidos totales se determinaron por extracción con éter etílico de la muestra desecada, por el método de Soxhlet; los glúcidos reductores totales por colorimetría, mediante el paso de ácido pícrico a picramato sódico; los aminoácidos por colorimetría con ninhidrina, con arreglo a la técnica de MOORE y STEIN (11). Los ácidos nucleicos fueron extraídos según la técnica de OGUR-ROSEN (12) seguida de valoración espectrofotométrica con aplicación de las fórmulas de FLECK y BEGG (5) y FLECK y MUNRO (6).

Las fracciones proteicas solubles se separaron por extracción de la muestra con distintos disolventes: albúminas con agua; globulinas con cloruro sódico al 10 %; prolaminas con alcohol al 70 %. En todos los casos se utilizó la cantidad de disolvente necesario para que los líquidos de extracción dieran negativa la reacción del biuret.

El estudio electroforético de la fracción de albúmina se efectuó sobre cellogel, con un voltaje de 220 V. durante dos horas y media. El colorante utilizado fue el Negro Amido B 10 y, posteriormente, se de-

coloró con disolvente apropiado. La valoración se efectuó por medida en un densitómetro y por disolución de cada fracción en ácido acético al 80 % con ulterior lectura a 620 nm.

Las actividades enzimáticas estudiadas corresponden a la isocitratoliasa y la malatodeshidrogenasa, cuya extracción se efectuó por el método descrito por LÓPEZ-PÉREZ (8). Posteriormente se llevaron a cabo las valoraciones espectrofotométricas según el procedimiento propuesto por DIXON y KORNBERG (3) para la isocitratoliasa, y el de BERGMAYER y BERNT (2) para la malatodeshidrogenasa. Ambas determinaciones enzimáticas se realizaron con una concentración de 0,1 a 1 mg/ml de proteína.

Resultados y discusión

Cambios en principios inmediatos de semilla completa. Puede observarse en la tabla I las diferencias encontradas en semillas sometidas a 47° C durante tres días con respecto a sus controles. Se han utilizado, en estas pruebas, semillas de distinta procedencia, con objeto de relacionar el «habitat» de crecimiento con la respuesta a un tratamiento de esta naturaleza. Se ha podido comprobar en todas las muestras una disminución de su contenido en humedad, mientras que los clásicos principios inmediatos presentan valores más altos por efecto del tratamiento.

El contenido total de proteínas solubles está ligeramente aumentado. El análisis de cada una de las fracciones componentes por separado indica que las albúminas y las globulinas son las que contribuyen preferentemente a este efecto global. Por otro lado, el estudio electroforético de cada grupo demuestra un mayor número de bandas proteicas en albúminas y globulinas para las semillas tratadas. Esto parece apuntar hacia una acción activadora de la temperatura sobre enzimas proteolíticos, que tiene como consecuencia la formación de proteínas de menor

Tabla I. *Principios inmediatos y aminoácidos en semilla completa normal (control) y tratada a 47° C durante tres días.*

Los aminoácidos (A.A.) vienen expresados en μ moles de leucina % de peso seco. Semillas procedentes de Cuéllar (tres años de almacenamiento), Coca y Huelva (un año de almacenamiento). Los valores se refieren a gramos por ciento de peso seco. La semilla control se mantenía a temperatura ambiente.

	Humedad	Lípidos	Frac. prot. solubles			Total Prot. sol.	A. A.	Glúc.
			Alb.	Glob.	Prol.			
<i>Semillas procedentes de Cuéllar</i>								
Control	6,97	52,78	9,35	1,52	0,26	11,13	900,26	0,327
Tratadas	3,70	48,92	8,52	3,14	0,29	11,95	1086,27	0,398
<i>Semillas procedentes de Coca</i>								
Control	6,20	52,60	9,15	1,83	0,62	11,60	926,40	0,348
Tratadas	4,32	49,95	8,50	3,06	0,72	12,28	1168,03	0,410
<i>Semillas procedentes de Huelva</i>								
Control	6,53	51,55	10,80	1,45	0,02	12,27	930,81	0,368
Tratadas	3,92	51,50	11,38	1,90	0,02	13,30	1079,80	0,381

peso molecular. Tanto la disminución de lípidos en semillas procedentes de lugares fríos, como el aumento en aminoácidos, indican también una mayor capacidad metabólica por parte de la semilla tratada con respecto a su control. Destaca el elevado contenido para aminoácidos libres. La disminución en el contenido lipídico por efecto del tratamiento es importante para este tipo de semilla por ser, su reserva principal, los lípidos. Resultados semejantes en cuanto a la movilización de este tipo de reserva se han encontrado en el otro tratamiento de ruptura del estado durmiente para semillas de pino: la estratificación (4, 15, 16).

Cambios en los principios inmediatos de embriones y endospermos. El estudio independiente de las dos partes que forman la semilla se ha realizado con muestras procedentes de Cuéllar, por ser las que presentan un efecto activador más claro de la temperatura sobre su comportamiento germinativo.

La disminución de humedad observada en semillas completas se refleja tanto en endospermos como en embriones, que presentan valores más bajos en las trata-

das en relación a los hallados para sus controles correspondientes (tabla II). La diferencia en el contenido lipídico para semilla completa se da solamente en el endospermo, lo que supone una movilización de reservas energéticas, índice de una activación metabólica general con influencia sobre el comportamiento germinativo posterior.

En cuanto al conjunto de proteínas solubles, el aumento visto en semilla completa se localiza preferentemente en el embrión, mientras que las variaciones en aminoácidos se observan de manera especial en endospermos, donde parece probable que la hidrólisis de proteínas, hacia formas de peso molecular más bajo, lleve también a la liberación de aminoácidos. El camino más probable para estas moléculas es su paso al embrión para formar nuevas proteínas, hipótesis que está de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio electroforético de la fracción de albúmina (fig. 1) donde se obtienen resultados similares a los de semilla completa. Tanto en embriones como en endospermos, se observa un mayor número de fracciones en muestras procedentes de semillas tratadas con respecto a los con-

Tabla II. Principios inmediatos y aminoácidos en embriones y endospermos tratados a 47° C durante tres días y controles (temperatura ambiente).

Los aminoácidos (A.A.) vienen expresados en μ moles de leucina % de peso seco. Semillas procedentes de Cuéllar (tres años de almacenamiento). Los valores se refieren a gramos por ciento de peso seco.

	Humedad	Lípidos	Frac. prot. solubles			Total Prot. sol.	A. A.	Glúc.
			Alb.	Glob.	Prol.			
<i>Embriones</i>								
Control	4,76	53,46	6,61	4,30	0,02	10,93	1819	0,649
Tratadas	4,02	53,77	9,73	5,07	0,15	14,95	1550	0,768
<i>Endospermos</i>								
Control	6,27	47,59	6,40	3,86	—	10,26	1988	0,331
Tratadas	3,86	45,50	7,75	1,52	0,06	9,33	2574	0,447

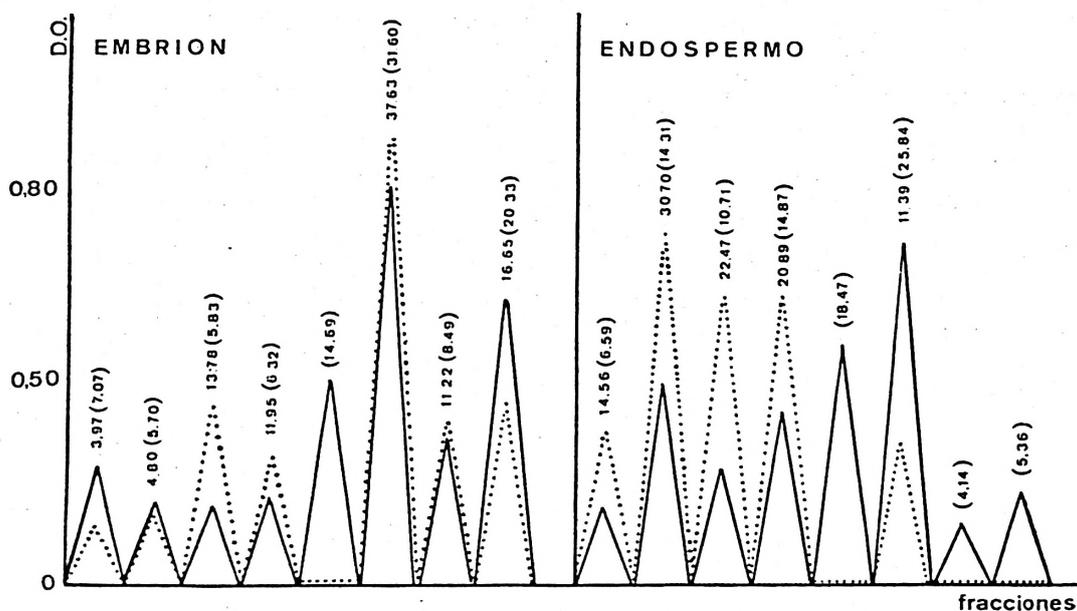


Fig. 1. Fracción de albúmina contenida en endospermos y embriones por electroforesis sobre cellogel y valorados por medida en un densitómetro.

Controles (...); tratadas a 47° C durante tres días (—). Los números representados sobre cada pico corresponden a la valoración colorimétrica a 620 nm, previa disolución en acético al 80 %, correspondiendo los valores entre paréntesis a muestras tratadas durante tres días a 47° C. Semillas procedentes de Cuéllar (tres años de almacenamiento). Dirección del desarrollo electroforético, de izquierda a derecha.

troles correspondientes. La aparición, principalmente en endospermos, de fracciones con mayor movilidad, está de acuerdo con el posible aumento de la actividad proteolítica por tratamiento a temperaturas su-

periores a la ambiente, ya señalado por MAYER y POLJAKOFF-MAYBER (10).

Cambios en ácidos nucleicos y actividades enzimáticas. En los ensayos efec-

Tabla III. *Actividades enzimáticas de isocitratoliasa (IL) y malatodeshidrogenasa (MDH) en semillas controles y tratadas a 47° C durante tres días.*

La actividad enzimática específica de isocitratoliasa viene expresada en μ moles de fenilhidrazona glioxilica obtenida en 10 min/mg de proteína y la malatodeshidrogenasa en μ moles de sustrato convertido en 1 min/mg de proteína. Semillas procedentes de Huelva (un año de almacenamiento).

Días sumergidas en agua	Actividad enzim.		Proteínas (mg/ml)		Act. enz. específica	
	IL	MDH	IL	MDH	IL	MDH
Control						
0	—	—	10,51	—	—	—
2	—	7,489	12,90	—	—	5,805
4	2,94	8,708	13,60	—	2,16	6,403
Tratadas						
0	—	—	10,72	—	—	—
2	—	5,747	12,28	—	—	4,678
4	3,23	8,708	13,85	—	2,34	6,287

tuados sobre ácidos nucleicos, se dan pequeñas diferencias en los niveles de RNA (3 mg %) y de DNA (12 mg %), coincidentes con el incremento en aminoácidos libres, lo que puede relacionarse a nivel de síntesis de nuevas proteínas. Igualmente han sido observados aumentos en ácidos nucleicos (RNA y DNA) por efecto del proceso de estratificación (7, 17). El estudio de dos actividades enzimáticas que intervienen en el metabolismo de conversión de lípidos a glúcidos, isocitratoliasa y malatodeshidrogenasa, se efectuó en endospermos (tabla III). Los valores encontrados en semillas tratadas muestran cambios poco significativos, si bien aparece la actividad malatodeshidrogenasa antes que la isocitratoliasa; no obstante, conviene reseñar que estos análisis fueron efectuados con semillas procedentes de Huelva, en las que se observa poca variación en el contenido lipídico por efecto del tratamiento.

Resumen

El tratamiento de semillas de *Pinus pinca* a temperaturas de 47° C durante 72 horas determina una pérdida de su contenido en humedad y algunos cambios en los principios

inmediatos, con diferencias de comportamiento en conexión con el distinto «habitat» de crecimiento.

El contenido en lípidos no varía por efecto del tratamiento térmico en semillas procedentes de lugares cálidos. En cambio, el nivel lipídico total es menor en semillas tratadas cuando proceden de lugares fríos, con respecto a sus respectivos controles; este cambio se localiza exclusivamente en endospermo.

Las mayores variaciones observadas por efecto del tratamiento térmico de las semillas se refieren a la fracción de aminoácidos libres con un gran aumento en endospermos y menor en embrión, y también a las proteínas solubles en cantidad global mayor, principalmente en el embrión.

Las proteínas correspondientes a la fracción de albúmina y globulina se encuentran en mayor proporción y algunas aparecen con velocidad de migración electroforética más alta. Este efecto del tratamiento se da preferentemente en embrión y endospermo.

Bibliografía

1. BARTON, L. V.: *Enycl. Plant. Physiol.*, 15, 699, 1965.
2. BERGMAYER, H. V. y BERNT, E.: En «Methods of enzymatic analysis». Verlag Chemie, Weinheim, 1965.
3. DIXON, G. H. y KORNBERG, H. L.: *Biochem. J.*, 72, 3P, 1959.

4. FIGUEROA, S.: *XII Reunión SEB*. Madrid, 1972, 111.
5. FLECK, A. y BEGG, D.: *Biochem. Biophys. Acta*, **108**, 333, 1965.
6. FLECK, A. y MUNRO, H. N.: *Biochem. Biophys. Acta*, **55**, 561, 1962.
7. KHAN, A. A., HEIT, C. E. y LEOPOLD, P. C.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **33**, 391, 1968.
8. LÓPEZ-PÉREZ, M. y GIMÉNEZ-SOLVES, A.: *Anal. Real Acad. Farm.*, **39**, 251, 1973.
9. MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C. J.: *Anal. Real Acad. Farm.*, **40**, 91, 1974.
10. MAYER, A. M., POLJAKOFF-MAYBER, A.: En «The germination of seeds». Pergamon Press. Oxford, 1963.
11. MOORE, S. y STEIN, W. H.: *Anal. Chem.*, **30**, 1190, 1958.
12. OGUR, M. y ROSEN, G.: *Arch. Biochem.*, **11**, 269, 1946.
13. REES, A. R.: *Nature*, **189**, 74, 1961.
14. SANZ, M., MARTÍNEZ, S., GIMÉNEZ-SOLVES, A. y SANTOS-RUIZ, A.: *Rev. Frio*, **11**, 146, 1966.
15. SANZ, M., GONZÁLEZ, P., GIMÉNEZ-SOLVES, A. y SANTOS-RUIZ, A.: *Proc. XIIIth Internat. Congress Refrigeration*. Madrid, 1969, p. 1049-1062.
16. SANZ, M. y GIMÉNEZ-SOLVES, A.: *An. Real Acad. Farm.*, **36**, 433, 1970.
17. SANZ, M. y PALACIOS-ALAI, E.: *An. Real Acad. Farm.*, **38**, 673, 1972.
18. STOKES, P.: *Encycl. Plant. Physiol.*, **15**, 746, 1965.
19. TOOLE, V. K. y BAILEY, W. K.: *Plant Physiol.*, **39**, 45, 1964.