

1987-B

REG. No. 080565933

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



FACULTAD DE CIENCIAS
HERBARIO
HERFACUG

EFFECTO DE POLIAMINAS EN LA GERMINACION DE
Medicago sativa L. (Alfalfa) BAJO ESTRES DE SALINIDAD

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

EVA NOEMI OBLEDO VAZQUEZ

GUADALAJARA, JAL.

1991

**Esta tesis está dedicada a mis padres
por el esfuerzo y apoyo que me brindaron
durante la realización de mi carrera.**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud:

A mi director de tesis, Dr. Benjamín Rodríguez Garay y a mi asesor de tesis, Dr. Gonzalo Flores Martínez, por su guía y apoyo para la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Asociación Civil (CIATEJ A.C.) por la ayuda brindada para el desarrollo de esta tesis.

A las personas y organizaciones que colaboraron directamente en este trabajo:

Arancia S.A.

Dr. Adán Obledo Navarro.

Tgo. Georgina Obledo Vázquez.

Ing. Gerardo Delgadillo Navarro.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección

Expediente

Número 358/91

C. EVA NOHEMI OBLEDO VAZQUEZ
 P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "Función de poliaminas en la germinación de Medicago Sativa - L. bajo estrés de salinidad" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informo que ha sido aceptado como Director de dicha tesis el Dr. Benjamin Rodríguez Garay.

A T E N T A M E N T E
 "PIENSA Y TRABAJA"
 "AÑO LIC. JOSE GPE. ZUNO HERNANDEZ"
 Guadalajara, Jal., Mayo 27 de 1991.
 EL DIRECTOR



M. EN C. CARLOS BEAS ZARATE

EL SECRETARIO FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

M. EN C. MARTIN PEDRO TENA MEZA

c.c.p. Dr. Benjamin Rodríguez Garay . - Dir. de Tesis
 c.c.p. El expediente

'gpg

Al contestar este oficio cítese fecha y número



CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA
Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A.C.

11 de Septiembre de 1991

M.C. Carlos Beas Zárate
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
PRESENTE.

Por medio de la presente me permito informarle que después de haber revisado el manuscrito de la tesis de la pasante de Biología EVA NOEMI OBLEDO VAZQUEZ, titulada "Efecto de poliaminas en la germinación de Medicago sativa L. (alfalfa) bajo estrés de salinidad", la cual fué realizada bajo mi dirección en el Departamento de Cultivo de Tejidos Vegetales del CIATEJ, A.C., considero que no existe ningún inconveniente y doy mi aprobación para la impresión final de la misma.

ATENTAMENTE

Dr. Benjamin Rodríguez Garay.
Director de tesis.

INDICE

I. INTRODUCCION

II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

II.1 Salinidad

II.2 Mecanismos de tolerancia a sales en las plantas

II.3 Poliaminas

II.3.1 Poliaminas comunes

II.3.2 Poliaminas no comunes

II.3.3 Inhibidores de la biosíntesis de poliaminas

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

IV. MATERIALES Y METODOS

IV.1 Materiales

IV.1.1 Material biológico

IV.1.2 Agentes estresantes

IV.1.3 Poliaminas

IV.2 Métodos

IV.2.1 Etapa I.- Establecimiento de los rangos máximos de estrés.

IV.2.2 Etapa II.- Igualación del potencial osmótico NaCl-PEG

IV.2.3 Etapa III.- Evaluación de la tolerancia al estrés de salinidad y de sequía en las cuatro variedades

IV.2.4 Etapa IV.- Aplicación de poliaminas

V. RESULTADOS

V.1 Comparación de la germinación de la variedad Atoyac bajo estrés de sequía

V.1.1 Número de semillas germinadas

V.1.2 Peso de las plántulas obtenidas

V.1.3 Talla de las plántulas

V.2 Comparación de la germinación de la variedad

Atoyac bajo estrés de salinidad

V.2.1 Número de semillas germinadas

V.2.2 Peso de las plántulas obtenidas

V.2.3 Talla de las plántulas

V.3 Relación raíz-parte aérea en ambos tipos de estrés

V.4 Efecto de las poliaminas

V.4.1 Elección del tratamiento de sal a utilizar
en presencia de poliaminas

V.4.2 Efecto de poliaminas en la germinación de
las variedades estudiadas

V.4.3 Efecto de poliaminas en el peso de las
plántulas obtenidas de la germinación bajo estrés
de sal en las variedades estudiadas

V.4.4 Efecto de poliaminas en la talla de las
plántulas obtenidas de la germinación bajo estrés
de sal en las variedades estudiadas

V.4.5 Concentraciones óptimas de poliaminas

VI. DISCUSION

VII. CONCLUSIONES

VIII. BIBLIOGRAFIA

IX. APENDICES

IX.1 Apendice I.- Metodología seguida en cada repetición

IX.2 Apendice II.- Relación en porcentaje de la raíz al aumentar la concentración de NaCl en las variedades de Medicago sativa L. estudiadas

I. INTRODUCCION

Como consecuencia de la demanda cada vez mayor de alimentos y la pérdida paulatina de tierras de cultivo, se busca la posibilidad de utilizar zonas áridas y semiáridas, las cuales pueden contribuir a la producción de alimentos.

En México las zonas áridas y semiáridas ocupan 806 000 Km² aproximadamente, lo que representa un 41% de la superficie del territorio nacional (Castellanos et al., 1987) .

Los suelos salinos se encuentran de manera natural en regiones áridas y semiáridas, este problema muchas veces se agrava por un pobre drenaje natural o métodos deficientes de irrigación. Mientras la irrigación puede aliviar las condiciones de sequía, la baja calidad del agua de riego incrementa los problemas de salinidad que implican problemas para los cultivos (Krauer, 1980) debido al aumento de la presión osmótica y a la toxicidad de la sal (Bliss et al., 1984; Terry and Waldron, 1984).

Se ha observado en algunos organismos que soportan cierto grado de estrés, la presencia de altas concentraciones de poliaminas, que son un grupo de compuestos orgánicos que se caracterizan por poseer por lo menos dos grupos amina en su estructura (Kuehn et al., 1990a).

A pesar de que las poliaminas se encuentran de manera natural en todos los seres vivos (Meijer and Simmonds, 1988; Kuehn et al., 1990 b) es poco lo que se conoce acerca de sus funciones (Prakash et al., 1988).

Las poliaminas parecen estar implicadas en una gran cantidad de funciones entre las que se encuentra la respuesta a estrés ábiotico (Lucarini and Sangwan, 1987), probablemente por estabilización de membranas (Meijer and Simmonds., 1988).

En este trabajo se estudió la reacción de la alfalfa en su estadio de germinación, al adicionarle de manera exógena las poliaminas: putrescina, espermina y espermidina en tratamientos paralelos.

Se eligió la alfalfa por ser la reina de las forrajeras ya que contiene el doble de proteína digerible que el trebol, (*Trifolium spp.*) cuatro veces más que el heno de trebol y fieno o ensilaje de maíz (*Zea mays*), es muy rica en minerales, y es una fuente importante de vitamina A (Hughes, 1981), además este trabajo forma parte de un proyecto de mejoramiento de alfalfa que tiene como finalidad lograr líneas tolerantes a estrés de salinidad el cual se está realizando en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del estado de Jalisco, Asociación Civil (CIATEJ A. C.).

II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

II.1 Salinidad

La salinidad desde el punto de vista agrícola se refiere a la presencia de sales tanto en el agua como en el suelo, en concentraciones tales que pueden interferir con el crecimiento de las plantas.

El cloruro de sodio (sal común), es algunas veces la sal dominante, pero el término salinidad incluye cloruros, sulfatos y bicarbonatos de sodio, calcio, magnesio y potasio. La concentración de estas sales se expresa de varias formas, entre las más comunes se encuentran:

conductividad eléctrica	decisiemens/metro
peso por volumen	miligramos/litro
partes por millón	partes por millón
concentración de una sal	Molaridad

Para determinar si un suelo tiene problemas de salinidad puede compararse la cantidad de sal que presenta un suelo normal respecto a un suelo salino (Tabla 2.1).

SUELO NORMAL	SUELO SALINO
640 mg/l	2,560 mg/l
1 ds/m	4 ds/m
0.011M de NaCl	0.044M de NaCl

Tabla 2.1 Comparación en cantidad de sales de un suelo normal y un suelo salino (Venne, 1984).

Los suelos sódicos y salinos se encuentran de manera natural en regiones áridas y semiáridas. La condición es agravada debido al pobre drenaje del suelo, los métodos inapropiados de irrigación, la baja calidad del agua de riego, insuficiente cantidad de agua disponible para una adecuada lixiviación y por la insuficiencia de sitios disponibles para el agua que ha lixiviado sales del suelo.

La salinidad afecta 1.693 millones de has. de los 22.518 millones de has. de terreno no federal en California, sin embargo, resulta más alarmante el hecho de que de los 4.09 millones de has. irrigadas en California, 1.174 millones están afectados (Backlund and Hoppes, 1984).

Los principales efectos de la salinidad en las propiedades del suelo son, hinchamiento de suelos barrosos, dispersión de partículas finas; formación de costra y baja en las propiedades de transmisión del agua. La cantidad de sodio absorbido por el suelo y la cantidad de sal en el agua de irrigación tienen una gran influencia en el grado en que afecta la salinidad las propiedades del suelo (Rolston et al., 1984).

En las áreas irrigadas con problemas de salinidad es importante conocer el tipo de sal, ya que los suelos y las plantas reaccionan de manera distinta a diferentes sales (Biggar et al., 1984).

El estrés salino inhibe el crecimiento durante todo el ciclo de vida de la planta, pero generalmente la semilla en germinación es más sensible. El estrés salino imita en muchas formas al estrés de agua. El principal efecto del estrés salino es osmótico, sin embargo, debido a que algunas sales son más inhibitorias que otras, se involucran efectos tóxicos específicos.

Aunque el NaCl se encuentra entre las sales poco tóxicas, es una de las más comunes y por lo tanto, muy problemática para la agricultura.

No se conocen los mecanismos por los cuales la sal inhibe la germinación de la semilla, pero existe una buena razón para sospechar que las membranas celulares son sitios de efecto primario o secundario de las sales. El NaCl interfiere con una gran variedad de funciones de membrana, incluyendo la permeabilidad, el transporte de solutos tanto orgánicos como inorgánicos y la secreción. La sal algunas veces causa alteraciones estructurales (Bliss et al., 1984).

El estrés salino induce cambios en la composición de los lípidos de membrana en algunas plantas y ocasiona liberación de proteínas de membrana en células de raíces.

La interacción de las sales con las membranas celulares durante la germinación se complica por los dramáticos cambios que ocurren en la semilla durante este tiempo. El cambio de un estado seco a uno hidratado por imbibición de agua tiene un profundo efecto potencial en las membranas de las semillas, ya que la estructura de la membrana depende en

grán medida de la interacción de las moléculas de membrana con el agua. Algunos cambios de membrana probablemente ocurren durante la imbibición, cuando la cantidad de agua alrededor de las membranas celulares aumenta, sin embargo, la naturaleza exacta de estos cambios es aún incierta.

Utilizando iones de plata que reaccionan con el NaCl formando cristales insolubles de plata, visibles al microscopio electrónico se ha demostrado que el cloruro puede penetrar en la membrana cuando las semillas son empapadas en NaCl. Los cristales de cloruro de plata han sido observados en el citoplasma de células de cotiledón, por lo tanto es posible que la sal ejerza algún efecto tóxico en el interior celular además de su efecto en las membranas durante la imbibición (Bliss et al., 1984).

La sal tiene además un efecto negativo en el crecimiento de las plantas, debido al potencial osmótico que impide que las raíces puedan tomar agua (Terry and Waldron, 1984).

Se ha estudiado el efecto de la sal en la fotosíntesis de la remolacha azucarera que es una planta tolerante a la salinidad y se ha demostrado que la reducción en el crecimiento es debido principalmente a una disminución del área disponible para la fotosíntesis más que por una reducción en el rango de fotosíntesis por área foliar (Terry and Waldron, 1984).

11.2 Mecanismos de tolerancia a sales en las plantas

De acuerdo a su respuesta a la salinidad las plantas pueden ser glicófitas o halófitas.

Las glicófitas o no halófitas, a las cuales pertenecen la mayoría de las especies cultivadas, tienen una respuesta a la salinidad muy variada, desde muy sensibles a la sal hasta moderadamente resistentes.

Muchas glicófitas responden a concentraciones relativamente bajas de sal (menos de 6,000 mg/l, aproximadamente 100mM) por exclusión de sales, particularmente por baja en el transporte neto de sodio o cloro o ambos de raíces a brotes. La mayoría de estas glicófitas excluidoras de sal no pueden ajustarse osmóticamente al bajo potencial externo de agua, a través de un incremento en la síntesis de solutos orgánicos y por lo tanto pueden sufrir un decremento en el turgor, de ahí que la salinidad puede inducir un estrés osmótico en este tipo de glicófitas. La elongación de las hojas es particularmente sensible al estrés osmótico. Algunas glicófitas relativamente resistentes a sales experimentan algún déficit de agua en los tejidos en crecimiento, en lugar de los efectos de los iones específicos.

Otras glicófitas sensibles a la sal como muchas leguminosas, y algunas especies frutales, tienen un control inadecuado sobre la entrada de iones cuando son expuestas a un medio salino. La entrada no controlada de sales inicia con una alta concentración interna de sales y esto las daña porque

los mecanismos de compartamentación de sales no están bien desarrollados en estas plantas. Este daño es causado primariamente por toxicidad de iones y no por estrés osmótico.

Los sitios de toxicidad por iones pueden ser las membranas celulares, con la p6sible consecuencia de empeorar el transporte de iones al iniciar el desbalance de iones con los consecuentes efectos adversos en la nutrici3n mineral de la planta.

Adem6s, las altas concentraciones de sal en el citoplasma pueden tambi6n da1ar enzimas y organelos (Lauchi and Epstein, 1984).

Las hal3fitas son plantas tolerantes a la salinidad, nativas de habitats salinos. Se incluyen dos grupos que responden de manera ditinta al incrementar la salinidad del suelo.

La mayoría de la monocotiledoneas hal3fitas crecen pobremente a concentraciones de NaCl que exceden los 10,000 mg/l (170 mM) y su crecimiento no es estimulado por concentradciones medias o bajas de salinidad.

En muchas dicotiledoneas, particularmente las pertenecientes a la familia Chenopodiacea como la Salicornia, su crecimiento es estimulado cuando la salinidad aumenta a cerca de 15,000 mg/l (250mM) de NaCl y mayor salinidad reduce el crecimiento. Estas hal3fitas, pertenecientes a las quenopodiaceas, responden a la salinidad tomando altos

rangos de NaCl y acumulando estos iones en sus hojas, y utilizan esta sal acumulada para ajustarse osmóticamente al bajo potencial de agua del suelo. Un factor importante de este tipo de ajuste osmótico es el aislamiento de la sal acumulada en vacuolas de células de las hojas, almacenando la concentración de sal en el citoplasma y organelos en bajo nivel para que no interfieran con las funciones de sus enzimas y con su mecanismo metabólico.

Esta compartamentación tiene un gran significado para el desarrollo de halófitas en ambientes salinos.

Para el ajuste osmótico del citoplasma existen muchas veces sustancias compatibles con enzimas y con el metabolismo. Estos solutos compatibles son generalmente compuestos orgánicos como los compuestos nitrogenados; glicina-betaina, prolina y, en algunas plantas, azúcares-alcoholes como el sorbitol.

Además, el potasio es mantenido en el citoplasma a concentraciones del orden de 4,000 mg/l (100 mM).

Para que el ajuste osmótico sea funcional, el potencial del soluto en el citoplasma y en las vacuolas deben ser iguales. El ajuste osmótico a través de la acumulación de sales en las halófitas mantiene el turgor, el cual es necesario para continuar el crecimiento (Lauchi and Epstein, 1984).

II.3 Poliaminas

Las poliaminas son un grupo de compuestos orgánicos que se caracterizan por tener por lo menos dos grupos amina (NH_2) en su estructura unidos a una cadena hidrocarbonada (Kuehn et al., 1990a).

En sistemas microbianos, las poliaminas han mostrado ser moderadoras de fusión de membrana, mostrando preferencia diferencial por alineación de fosfolípidos de membrana y mediador preferencial uniendo o expulsando proteínas de la superficie de membrana. Por estas y otras observaciones, las poliaminas tienen una importante implicación en la protección de la integridad estructural y funcional tanto de procariontes como de eucariontes susceptibles a shock osmótico (Rodríguez-Garay et al., 1989).

Se han encontrado poliaminas no comunes en bacterias creciendo entre 60 y 90°C y en microorganismos halofílicos.

El estudio de la biosíntesis de poliaminas en sistemas microbianos es un camino prometedor para desarrollar quimioterapias efectivas para la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, como el caso de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* donde se inhibió su crecimiento al utilizar inhibidores de precursores de poliaminas y el efecto fué totalmente contrarrestado al agregar exogenamente las poliaminas, reuniendo con esto más evidencias que indican que las poliaminas efectivamente están implicadas en funciones esenciales de crecimiento y diferenciación celular (Pfaller et al., 1988).

Los trabajos sobre la biosíntesis de poliaminas en sistemas microbianos se han realizado en su mayoría en Escherichia coli y en Saccharomyces cerevisiae (Pfaller et al., 1988).

En plantas superiores el estudio de las poliaminas tuvo una limitada atención antes de 1977. Debido a la reciente acumulación de evidencias que indican que las poliaminas pueden ser consideradas como una clase de factores de crecimiento en plantas, han despertado el interés de los fisiólogos.

Las poliaminas probablemente actúan como mensajeros secundarios de hormonas entre células individuales (Young and Galston, 1982). La senescencia de las hojas en los vegetales involucra una secuencia de eventos degradativos que culminan en bajos niveles de clorofila, ácidos nucleicos y proteínas, actividad fotoquímica baja y la desintegración de la ultraestructura de cloroplastos, aunque la naturaleza del disparo de eventos y el orden de los cambios pueden variar con el material vegetal y con las condiciones de envejecimiento, es generalmente aceptado que la baja en los niveles de clorofila es el resultado final de eventos previos a la senescencia (Thimann, 1980). Se ha encontrado que las poliaminas, en la oscuridad, previenen la senescencia de muchas plantas dicotiledoneas y cereales. La espermina retarda por un periodo de 48 horas la baja en

concentración 1mM (Kaur-Sawhney et al., 1982). La manera precisa por la cual las poliaminas retardan la senescencia está en espera de ser aclarada (Slocum et al., 1984).

En cultivo de tejidos vegetales se ha encontrado que las poliaminas ejercen un débil efecto semejante a la auxina en explantes de tubérculos de Helianthus ruberosus (Meijer and Simmonds, 1988). En tabaco se ha observado que se requieren altos niveles de poliaminas para la diferenciación floral. También se ha reportado que su concentración se incrementa substancialmente durante la regeneración de plantas a partir de protoplastos de Vigna acconitifolia (Meijer and Simmonds, 1988).

Se ha estudiado la función de las poliaminas durante la embriogénesis somática en cultivos de células en suspensión de Daucus carota y se ha observado que los niveles de putrescina y espermina se incrementan después de la transferencia a medio para la formación de embriones somáticos en ausencia de 2,4-D, esto está correlacionado con el incremento de arginina con actividad descarboxilasa.

Para estudiar el efecto de las poliaminas se han realizado investigaciones en las cuales se ha inhibido la arginina descarboxilasa utilizando la alfa difluorometilarginina (DFMA) y se ha obtenido una reducción en los niveles de putrescina intracelular y en el número de embriones

somáticos formados a partir del cultivo celular (Meijer and Simmonds, 1988). En Carbaranthus roseus cultivada in vitro se ha encontrado que la incorporación de espermidina al medio nutritivo a concentraciones de 10^{-6} y 10^{-5} M estimulan el crecimiento del tubo polínico pero las concentraciones de 10^{-4} reducen el crecimiento. Para estudiar esto se ha inhibido la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico por acción de la metilglicoxal-bis guanilhidrazona (MGBG) y han sido recuperados con espermidina exógena, lo cual indica que la espermidina se requiere para la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico. La reducción del tubo polínico con 10^{-4} M de espermidina puede ser causada por toxicidad (Prakash et al., 1988). Las poliaminas se clasifican de acuerdo al número de aminas que poseen en: diaminas, triaminas, tetraaminas, pentaaminas, hexaaminas (Tabla 2.2).

DIAMINAS

1,3-DIAMINOPROPANO



PUTRESCINA



CADAVERINA



TRIAMINAS

NORSPERMIDINA (CALDINA)



ESPERMIDINA



AMINOPROPILCADAVERINA



HOMOESPERMIDINA

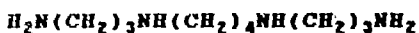


TETRAAMINAS

NORSPERMINA (TERMINA)



ESPERMINA



TERMOESPERMINA



PENTAAMINAS

CALDOPENTAMINA



HOMOCALDOPENTAMINA



HEXAAMINAS

CALDOHEXAMINA



Tabla 2.2 Estructuras de diaminas alifáticas y poliaminas

(Kuehn, inédito)

Existe otra clasificación de las poliaminas que se utiliza con fines prácticos dividiendo a las poliaminas en comunes, no comunes y superiores (Tabla 2.3).

COMUNES

1,3-DIAMINOPROPANO

PUTRESCINA

CADAVERINA

ESPERMIDINA

ESPERMINA

NO COMUNES

NOESPERMIDINA

AMINOPROPILCADAVERINA

HOMOESPERMIDINA

NOESPERMINA

TERMOESPERMINA

CALDOPENTAMINA

HOMOCALDOPENTAMINA

CALDOHEXAMINA

SUPERIORES

NOESPERMINA

TERMOESPERMINA

CALDOPENTAMINA

HOMOCALDOPENTAMINA

CALDOHEXAMINA



FACULTAD DE CIENCIAS
HERBARIO
HERFACUG

Tabla 2.3. Clasificación práctica de poliaminas (Kueh, inédito).

Las poliaminas se encuentran de manera natural en todos los seres vivos (Meijer and Simmonds, 1988; Kuhen et al., 1990b).

La historia de las poliaminas se remonta al año 1678 con el descubrimiento por Leewenhoek de la cristalización de espermina de semen humano, con su rudimentario microscopio. El nombre fué dado en 1888 por Ladenburg, y en el año 1920 fué confirmada su estructura por Rosenheim. En esa época se descubrió una base relacionada a la espermina nombrada espermidina.

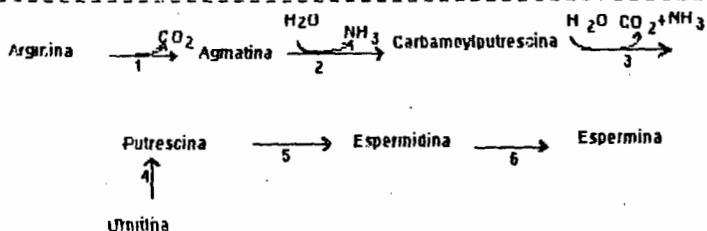
En 1885 se aislaron dos bases a partir de material animal en descomposición, en 1886 se confirmó la estructura de estas bases que fueron llamadas putrescina y cadaverina (Heby, 1986).

Actualmente, aunque es poco lo que se conoce acerca de las funciones de las poliaminas (Prakash et al., 1988), se sabe que muchas células dependen de ellas para múltiples procesos vitales. Se ha demostrado que las poliaminas interactúan con macromoléculas y biomembranas y regulan varios procesos celulares asociados con el crecimiento y el desarrollo (Prakash et al., 1987).

II.3.1 Poliaminas comunes

La biosíntesis de las poliaminas se lleva a cabo a partir de diferentes precursores en plantas y animales

En los vegetales la ruta metabólica inicia con el aminoácido arginina. En animales y sistemas microbianos inicia con la ornitina que pasa a putrescina por acción de la ornitina descarboxilasa (Figura 2.1)



Enzimas

- 1 arginina descarboxilasa
 - 2 agmatina ureidohidrolasa
 - 3 carbamoylputrescina hidrolasa
 - 4 ornitina descarboxilasa
 - 5 espermidina sintetasa
 - 6 espermina sintetasa
 - 7 S-adenisilmationina descarboxilasa.
-

Figura 2.1 Biosíntesis de poliaminas (Flores, 1989).

La putrescina y la espermidina son sintetizadas en todas las células, pero la espermina solo es sintetizada en células eucarióticas (Heby, 1986), aunque se ha encontrado en algunas bacterias termofílicas (Kuehn et al., 1990a).

A pH fisiológico la putrescina, espermidina y la espermina tienen 2, 3, y 4 cargas positivas respectivamente. La distribución de estas cargas positivas hace que se unan

fuertemente a los grupos fosfatos cargados negativamente en las regiones de doble helice de los ácidos nucleicos. Las moléculas de espermina ocupan un pequeño canal y neutralizan 2 grupos fosato por cada helice. Además, la espermina es el más potente inductor de la transición de Beta-DNA a Z-DNA. El Z-DNA es favorecido por secuencias que van alternando purinas y pirimidinas especialmente guanina y residuos de citocina (Heby, 1986).

La cadaverina es una diamina sintetizada a partir de lisina, se ha encontrado en plantas superiores (Kuehn et al., 1990a). El 1,3 diaminopropano Es una diamina que se ha encontrado en plantas superiores siendo más común en gramíneas.

II.3.2 Poliaminas no comunes

El termino poliaminas no comunes se debe a que son poliaminas con limitada distribución en la naturaleza.

Algunas de estas poliaminas no comunes fueron descubiertas en bacterias termófilicas, luego fueron encontradas en bacterias metanogénicas, *Vibrio*, *Cyanobacteria*, *Acetobacteria*, *Rhizobium*, *Lactobacilli*, *Rhodospseudomonas viridis* y ciertas algas (Hamana and Matsuzaki, 1982; Kneifel et al., 1986). Se ha postulado que ejercen un papel protector tanto en bacterias como en plantas adaptadas a ambientes extremos (Flores, 1989; Oshima, 1978).

La homoespermidina ha sido encontrada en algunas plantas , es una triamina formada de moléculas de putrescina.

La norespermina y la norespermidina Fueron descubiertas en bacterias termofílicas y halofílicas. Posteriormente fueron encontradas en briofitas, musgos y algunas algas eucarióticas (Kuehn et al., 1990a) y recientemente se encontraron en la planta superior Medicago sativa L. (Rodriguez-Garay et al., 1989).

II.3.3 Inhibidores de la biosíntesis de poliaminas

Una contribución importante al estudio de la fisiología de las poliaminas ha sido dada por la producción y prueba de muchos inhibidores de sus enzimas biosintéticas (Sethi et al., 1988), además utilizando inhibidores de la biosíntesis de poliaminas se podrían seleccionar células con amplificación génica que es un mecanismo bien documentado por el cual las células, particularmente las de mamíferos inferiores, desarrollan la capacidad para satisfacer la demanda al incrementar la cantidad de productos de genes específicos bajo toxicidad o estrés metabólico (Stark and Wahl, 1984; Schimke, 1984). Por lo cual el utilizar inhibidores de la biosíntesis de poliaminas es una estrategia para construir plantas sobreproductoras de poliaminas con potencial para incrementar tolerancia a ambientes extremos como sequía, calor y salinidad. Además, de acuerdo a los efectos observados en el desarrollo de mamíferos se ha sugerido que el inhibidor alfa difluorometilornitina (DFMO) podría utilizarse como abortivo en animales domésticos (Heby, 1986).

Los inhibidores más efectivos y comunmente utilizados se muestran en la tabla 2.4.

DIFLUOROMETILORNITINA (DFMO)

DIFLOUROMETILARGININA (DFMA)

METILGLIOXAL BIS GUANILHIDRAZONA (MGBG)

METILGLIOXAL BIS BUTILAMINOHIDRAZONA (MGBB)

S-ADENOSIL-1,8-DIAMINO-3-THIOOCTANO (AdoDATO)

SULFATO DE DICLOEXILAMONIO (CHA)

S-METIL-5'-METILTIOADENOSINA (metil-MTA)

Tabla 2.4 Inhibidores de la biosíntesis de poliaminas.

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

La variedad Atoyac de Medicago sativa L. presenta mayor tolerancia al estrés de salinidad y/o de sequía comparada con otras poblaciones.

La presencia de poliaminas exógenas al momento de la germinación de Medicago sativa L. bajo estrés de salinidad, incrementa la cantidad de semillas germinadas y el vigor de las plántulas obtenidas.

OBJETIVOS

Comprobar si la variedad Atoyac de Medicago sativa L. presenta tolerancia al estrés de salinidad y/o de sequía en su germinación, al compararla con otras poblaciones.

Comprobar si la presencia de poliaminas en el medio de estrés de salinidad aumenta la tolerancia en la germinación de Medicago sativa L.

IV MATERIALES Y METODOS

IV.1 Materiales

IV.1.1 Material biológico

Se utilizaron cuatro poblaciones de Medicago sativa L.

La variedad Atoyac a la cual se le atribuye cierta tolerancia a la salinidad por los pobladores de zonas cercanas a la cuenca endorreica Zacoalco-Sayula, lo cual no ha sido comprobado científicamente (González-Eguarte, comunicación personal). La semilla se compró en una tienda de semillas en Atoyac, Jalisco.

La variedad Florida 77 sensible tanto a la salinidad como a la sequía (Currier, comunicación personal). La semilla de esta y de las restantes variedades fué donada por Currier K.

La variedad Mesilla, también sensible a la salinidad y a la sequía (Kuehn et al ., 1990a).

La variedad 7-S-92, la cual fué obtenida de plantas que presentan tolerancia tanto a la salinidad como a la sequía (Currier, comunicación personal)

IV.1.2 Agentes estresantes

Como agente de estrés de salinidad se utilizó el cloruro de sodio (NaCl) (Phillips, 1987; Flowers et al., 1977) marca MERCK.

Como agente simulador de sequía se utilizó Polietilenglicol 6000 (PEG) (Hasegawa et al., 1984) grado industrial de nombre comercial Pluracol E-6000 de Policoles S.A. México D.F.

IV.1.3 Poliaminas

Putrescina	Marca SIGMA	P-7505	St. Louis Missouri U. S. A.
Espermidina	Marca SIGMA	S-2501	St. Louis Missouri U. S. A.
Espermina	Marca SIGMA	S-2876	St. Louis Missouri U. S. A.

IV.2 Métodos

IV.2.1 Etapa I.- Establecimiento de los rangos máximos de estrés.

Se realizaron pruebas preliminares con diferentes concentraciones tanto de NaCl como de PEG en agua bidestilada con el fin de determinar la concentración en la cual ya no se presentó germinación. Los tratamientos utilizados fueron:

% PEG	MNaCl
0	0
5	0.05
10	0.10
15	0.15
20	0.20
25	0.25



FACULTAD DE CIENCIAS
HERBARIO
HERFACUG

Todas las pruebas preliminares se realizaron en la variedad Atoyac, ya que es de la única con la que se contó con semilla en gran cantidad.

IV.2.2 Etapa II.- Igualación del potencial osmótico NaCl-PEG

Se igualó el potencial osmótico de los tratamientos de molaridad de NaCl a los tratamientos de porcentaje de PEG, utilizando el método de regresión lineal para los datos obtenidos en un osmómetro marca Fiske OS. Los pares de tratamientos obtenidos fueron:

PEG(%)	NaCl(M)	P. Osmótico (MPa)
0	0	-0.100
5	0.016	-0.107
10	0.06	-0.325
15	0.14	-0.679
20	0.25	-1.179
25	0.39	-1.823

IV.2.3 Etapa III.- Evaluación de la tolerancia al estrés de salinidad y de sequía en las cuatro poblaciones

Se realizaron tres repeticiones(appendice I) por cada tratamiento en cada una de las poblaciones. Se analizaron los datos utilizando gráficas de líneas y puntos.

Estos datos sirvieron para elegir el tratamiento de NaCl utilizado en la aplicación de poliaminas.

IV.2.4 Etapa IV.- Aplicación de poliaminas

En esta etapa solo se utilizó el estrés salino.

Se realizaron pruebas preliminares utilizando concentraciones similares a las reportadas en la literatura para otras especies vegetales (Prakash et al., 1988; Bagni and Mengoli, 1986; Sethi et al., 1988).

Las concentraciones de cada una de las poliaminas utilizadas fueron 0, 10, 20 y 30 μM tanto en agua como en la solución salina elegida.

Con los resultados obtenidos en estas pruebas se determinó que:

i) o bien, las poliaminas no tenían efecto significativo al aplicarlas exógenamente al momento de la germinación de la variedad Atoyac de *Medicago sativa* L.

ii) o bien, las concentraciones que requiere son mayores a las que se reportan en la literatura para otras especies vegetales.

Debido a esta disyuntiva se diseñó una serie de tratamientos progresivos que iniciaron con la concentración más alta de las pruebas preliminares, estos tratamientos fueron, para cada poliamina:

0, 0.030, 0.060, 0.120, 0.240, 0.480, 1, 2, 4, 8 y 16 mM

Estos tratamientos se aplicaron a las tres variedades de interés, Atoyac, Florida 77 y Mesilla. No se incluyó la variedad 7-S-92 debido a la poca cantidad de semilla disponible.

Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo cuadrático mediante análisis de regresión con el fin de determinar la tendencia de cada población bajo estrés salino en presencia de cada una de las poliaminas por mínimos cuadrados.

REPORTE DE ANOMALIAS

CUCBA

A LA TESIS:

LCUCBA00201

Autor:

Obledo Vazquez Eva Noemi

Tipo de Anomalia:

Errores de Origen: Falta Folios Del TEMA III. Hipotesis y Objetivos

V. RESULTADOS

V.1 Comparación de la germinación de la variedad Atoyac bajo estrés de sequía.

V.1.1 Número de semillas germinadas

La germinación de las variedades Atoyac y 7-S-92 fueron estimuladas positivamente en presencia de sequía moderada, mientras que la germinación de la variedad Florida se mantuvo constante en los tres primeros tratamientos y la germinación de la variedad Mesilla presentó un efecto negativo con todos los tratamientos de sequía.

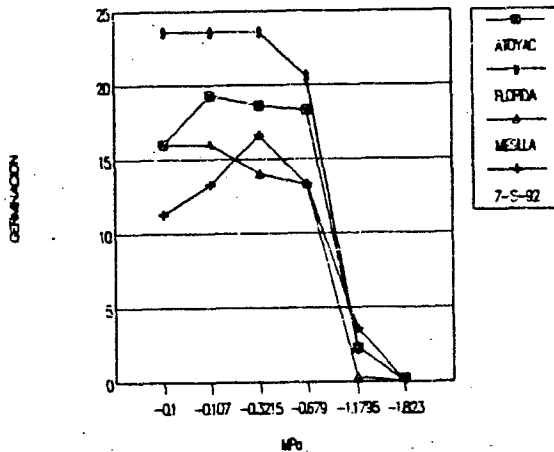


Figura 5.1 Efecto del estrés de sequía en la germinación de Medicago sativa L.

V.1.2 Peso de las plántulas obtenidas

El estrés de sequía afectó negativamente el peso de todas las variedades estudiadas (Figura 5.2).

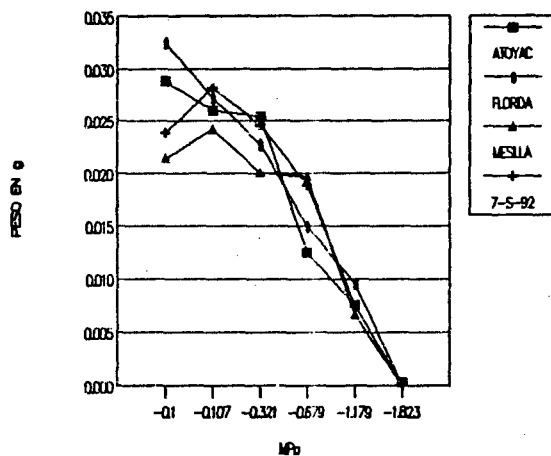


Figura 5.2 Efecto del estrés de sequía en el peso de las plántulas obtenidas.

V.1.3 Talla de las plántulas

La variedad mesilla presentó un efecto positivo con el primer tratamiento utilizado. Las restantes variedades sufrieron un efecto negativo con el estrés de sequía (Figura 5.3).

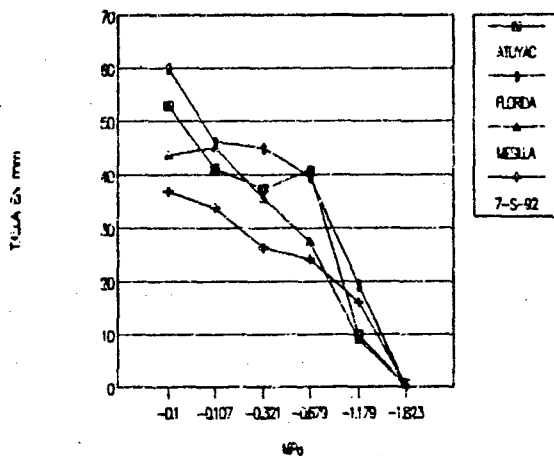


Figura 5.3 Efecto del estrés de sequía en la talla de las plántulas obtenidas.

V.2 Comparación de la germinación de la variedad Atoyac bajo estrés de salinidad.

V.2.1 Número de semillas germinadas

La variedad Florida fué la más afectada ya que presentó un efecto negativo con todos los tratamientos empleados. Las variedades Atoyac y 7-S-92 presentaron un efecto positivo con el primer tratamiento de salinidad. La variedad Mesilla fué la que presentó la mejor respuesta ya que tuvo un efecto positivo en los dos primeros tratamientos de salinidad (Figura 5.4).

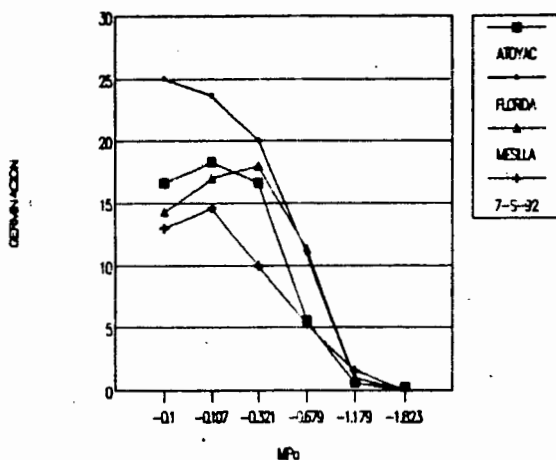


Figura 5.4 Efecto del estrés de sal en la germinación de *Medicago sativa* L.

V.2.2 Peso de las plántulas obtenidas

La variedad Mesilla fué la que presentó la mejor respuesta ya que tuvo un efecto positivo con el primer tratamiento, y aunque, el segundo tratamiento le afectó negativamente, este efecto no fué drástico. La variedad 7-S-92, también fué favorecida en su peso por el primer tratamiento, pero con el segundo tratamiento tuvo un drástico efecto negativo. Las variedades Atoyac y Florida presentaron un efecto negativo desde el primer tratamiento utilizado (Figura 5.5).

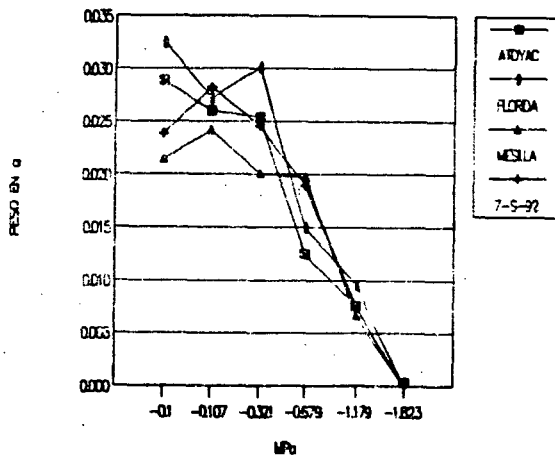


Figura 5.5 Efecto del estrés de sal en el peso de las plántulas obtenidas.

V.2.3 Talla de las plántulas

De manera contraria a lo observado en el peso, las variedades Atoyac y Florida, Presentaron un efecto positivo; La variedad Atoyac con los dos primeros tratamientos y la variedad Florida con el primero. En cambio, las variedades mesilla y 7-S-92 presentaron efecto negativo con todos los tratamientos utilizados (Figura 5.6).

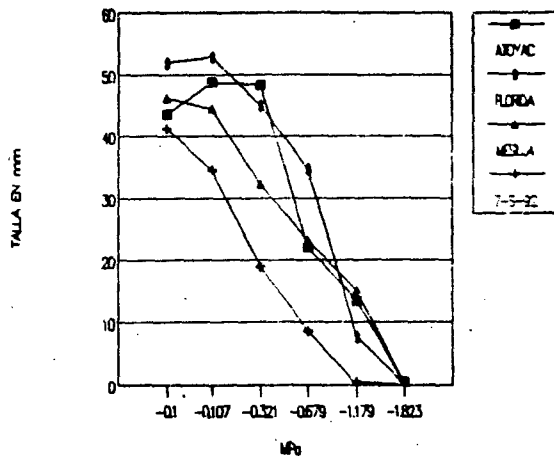


Figura 5.6 Efecto del estrés de sal en la talla de las plántulas obtenidas.

V.3 Relación raíz-parte aérea en ambos tipos de estrés

La variedad Atoyac fué la única que presentó una relación directa en cuanto al aumento en porcentaje de la raíz al aumentar la concentración del agente estresante, tanto de salinidad como de sequía (Figuras 5.7 y 5.8).

Las respuestas para las demás variedades se muestran en las figuras 5.9 a 5.14. Una apreciación más clara de este fenómeno se aprecia en las figuras del apéndice II,

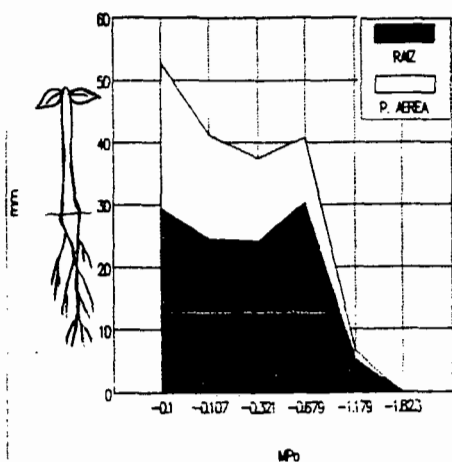


Figura 5.7 Relación raíz-parte aérea en la variedad Atoyac bajo estrés de sequía.

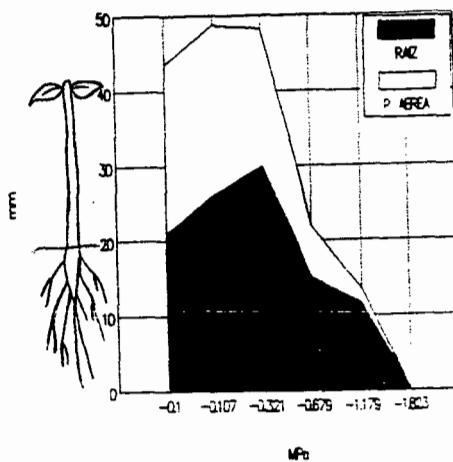


Figura 5.8 Relación raíz-parte aérea en la variedad Atoyac bajo estrés de sal.



FACULTAD DE CIENCIAS
HERBARIO
HERFACUG

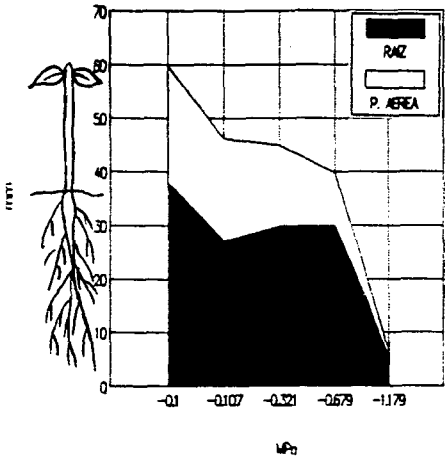


Figura 5.9 Relación raíz-parte aérea en la variedad Florida bajo estrés de sequía.

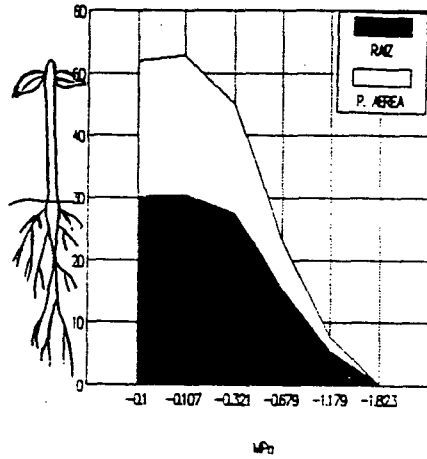


Figura 5.10 Relación raíz-parte aérea en la variedad Florida bajo estrés de sal.

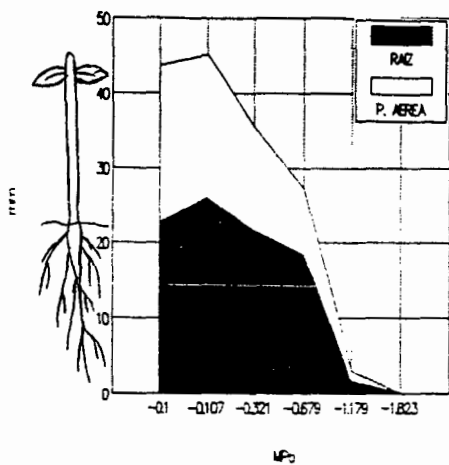


Figura 5.11 Relación raíz-parte aérea en la variedad Mesilla bajo estrés de sequía.

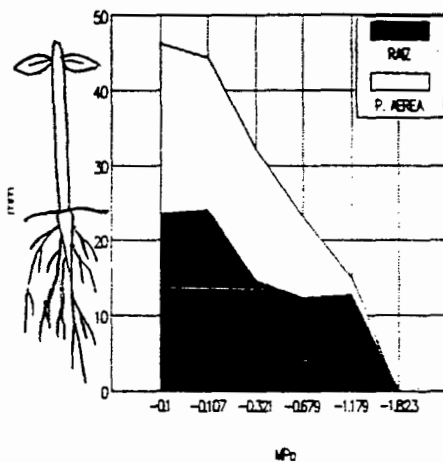


Figura 5.12 Relación raíz-parte aérea en la variedad Mesilla bajo estrés de sal.

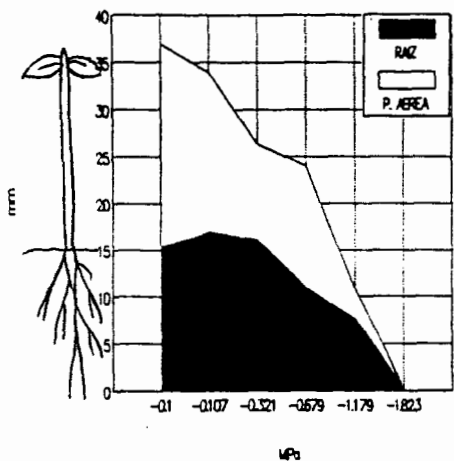


Figura 5.13 Relación raíz-parte aérea en la variedad 7-S-92 bajo estrés de sequía.

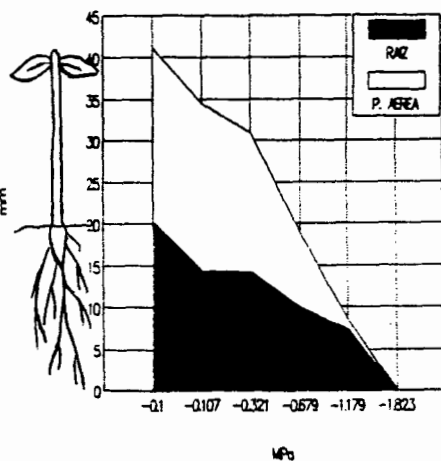


Figura 5.14 Relación raíz-parte aérea en la variedad 7-S-92 bajo estrés de sal.

V.4 Efecto de las poliaminas

V.4.1 Elección del tratamiento de sal a utilizar en presencia de poliaminas.

De acuerdo al análisis de resultados expuestos en las figuras 5.4, 5.5, y 5.6 se determinó que el tratamiento con -0.679 MPa, que corresponde a 0.14 M de NaCl es el que presenta las mejores condiciones para experimentar sobre el efecto de las poliaminas ya que todas las variedades son afectadas negativamente en su germinación, en su talla y en su peso, pero todavía existe suficiente germinación y sobrevivencia para estudiar el efecto de las poliaminas.

V.4.2 Efecto de poliaminas en la germinación de las variedades estudiadas.

La variedad Atoyac fue la única cuya respuesta, en todas las poliaminas utilizadas, se ajustó de manera significativa ($p < 0.05$ y $p < 0.1$) al modelo cuadrático de regresión, en el número de semillas germinadas bajo estrés salino (Tablas 5.1-5.7, Figuras 5.15-5.17).

La variedad Florida, se ajustó significativamente ($p < 0.05$), en la espermidina (Tabla 5.1 5.8 y 5.9), sin embargo el efecto de la espermidina fue incrementando al aumentar la concentración de la poliamina, pero no se alcanzó el óptimo en el intervalo de estudio (Figura 5.18).

La variedad Mesilla no presentó respuesta con ajuste significativo al modelo cuadrático de regresión, en el número de semillas germinadas (Tabla 5.1).

	Putrescina	Espemidina	Espermina
Atoyac	**	**	*
Florida	ns	**	ns
Mesilla	ns	ns	ns

Probabilidad < 0.05 (**)

Probabilidad < 0.1 (**)

No significativo (ns)

Tabla 5.1 Nivel de significancia del ajuste a un modelo cuadrático por regresión del efecto de poliaminas sobre la germinación bajo estrés de salinidad en las variedades estudiadas.

Los ajustes significativos a un modelo cuadrático implican que la forma de la gráfica es unimodal con un punto crítico único en el rango de estudio, que en la mayoría de los casos resultó ser un máximo ($d^2y/dx^2 < 0$). Ver figuras 5.15-5.28.

variable	coeficiente	error estandar	F
b	13.5216708	1.30404026	10.3691
b ₁	-.3105822	.46860324	-.6628
b ₁₁	-.8721046	.24604671	-3.5441

Total de interacciones = 3
 Total de evaluaciones de la función = 13

Tabla 5.2 Coeficientes del modelo cuadrático ajustado de la respuesta en la germinación de la variedad Atoyac a la putrescina.

fuerza	suma de cuadrados	g l	cuadrado F medio	F	p
modelo	1099.1902	3	366.3967	48.56	* *
error	52.809786	7	7.544255		
total	1152.0000				
total corregido	152.00000				
R ²	0.954158				

Tabla 5.3 Análisis de varianza de la regresión total de la respuesta en la germinación de la variedad Atoyac a la putrescina.

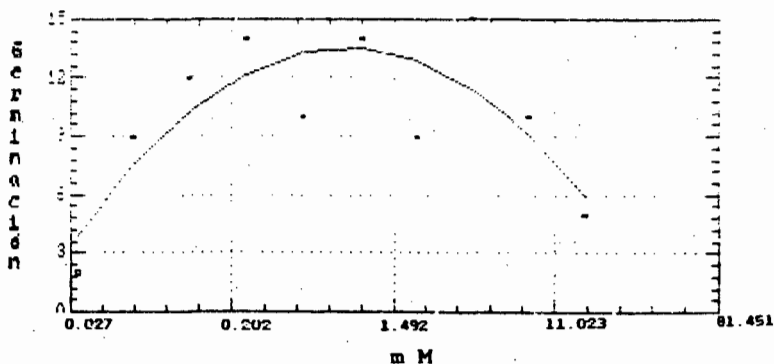


Figura 5.15 Regresión cuadrática ajustada de la respuesta en la germinación de la variedad Atoyac a la putrescina.

variable	coeficiente	error estandar	F
b	12.9612613	1.40233775	9.24261
b ₁	-1.3003842	0.50392617	-2.58051
b ₁₁	-0.8726933	0.26459566	-3.29821

Total de interacciones = 3
 Total de evaluaciones de la función = 13

Tabla 5.4 Coeficientes del modelo cuadrático ajustado de la respuesta en la germinación de la variedad Atoyac a la espermidina.

f fuente	suma de cuadrados	g l	cuadrado medio	F	p
modelo	1072.9286	3	357.6429	40.993	*
error	61.071369	7	8.724481		
total	1134.0000	10			
total corregido	173.60000	9			
R ²	0.946145				

Tabla 5.5 Análisis de varianza de la regresión total de la respuesta en la germinación de la variedad Atoyac a la espermidina.

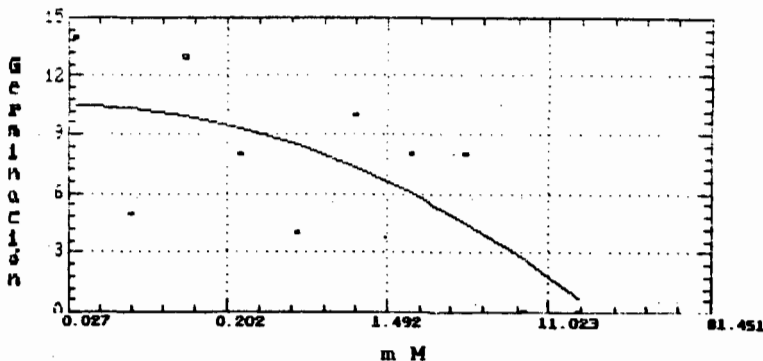


Figura 5.16 Regresión cuadrática ajustada de la respuesta en la germinación de la variedad Atoyac a la espermidina.

variable	coeficiente	error estandar	F
b	7.37046940	1.82241608	4.04434
b ₁	-1.7323302	0.65488015	-2.64526
b ₁₁	-0.24136592	0.34385681	-0.70194

Total de interacciones = 3
 Total de evaluaciones de la función = 13

Tabla 5.6 Coeficientes del modelo cuadrático ajustado de la respuesta en la germinación de la variedad Atoyac a la espermina.

fuerza	suma de cuadrados	g l	cuadrado medio	F	p
modelo	594.85992	3	198.28664	13.457	*
error	103.14008	7	14.73430		
total	698.00000				
total corregido	208.00000				
R ²	0.852235				

Tabla 5.7 Análisis de varianza de la regresión total de la respuesta en la germinación de la variedad Atoyac a la espermina.

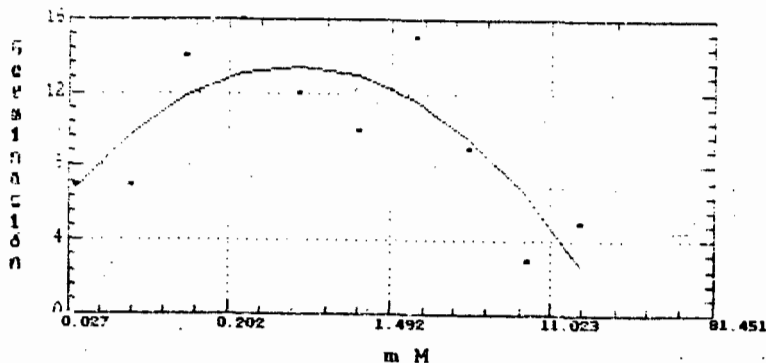


Figura 5.17 Regresión cuadrática ajustada de la respuesta en la germinación de la variedad Atoyac a la espermina.

variable	coeficiente	error estandar	F
b	11.1223827	1.72140373	6.46123
b ₁	1.9125582	0.61858164	3.09184
b ₁₁	0.5227144	0.32479762	1.60935

Total de interacciones = 3

Total de evaluaciones de la función = 13

Tabla 5.8 Coeficientes del modelo cuadrático ajustado de la respuesta en la germinación de la variedad Florida a la espermidina.

fuerce	suma de cuadrados	g l	cuadrado medio	F	p
modelo	1715.9767	3	571.9922	43.5101 *	
error	92.023317	7	13.146188		
total	1808.0000				
total corregido	220.40000				
R ²	0.949102				

Tabla 5.9 Análisis de varianza de la regresión total de la respuesta en la germinación de la variedad Florida a la espermidina.

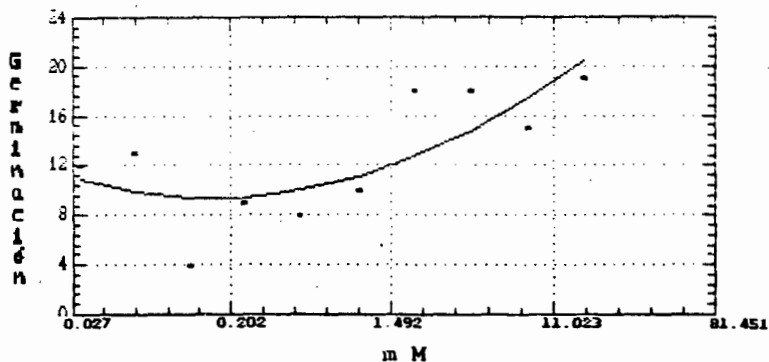


Figura 5.18 Regresión cuadrática ajustada de la respuesta en la germinación de la variedad Florida a la espermidina.

V.4.3 Efecto de poliaminas en el peso de las plántulas obtenidas de la germinación bajo estrés de sal en las variedades estudiadas.

La variedad Atoyac fué la única cuya respuesta, en todas las poliaminas utilizadas, se ajustó de manera significativa ($p < 0.05$ y $p < 0.1$) al modelo cuadrático de regresión, en el el peso de las plántulas bajo estrés salino (Tablas 5.10-5.16, Figuras 5.19-5.21).

La variedad Florida, se ajustó significativamente ($p < 0.05$), al modelo cuadrático de regresión en la espermina (Tabla 5.10, 5.17 y 5.18. Figura 5.22).

La variedad Mesilla no presentó respuesta con ajuste significativo al modelo cuadrático de regresión, en las poliaminas utilizadas en el peso de las plántulas (Tabla 5.10).

	Putrescina	Espermidina	Espermina
Atoyac	**	*	**
Florida	ns	ns	**
Mesilla	ns	ns	ns
Probabilidad < 0.05 (**)			
Probabilidad < 0.1 (**)			
No significativo (ns)			

Tabla 5.10 Nivel de significancia del ajuste a un modelo cuadrático por regresión del efecto de poliaminas sobre el peso de las plántulas bajo estrés de salinidad en las variedades estudiadas.

variable	coeficiente error estandar		F
b	239.755128	13.4308488	17.8511
b ₁	-11.181946	4.8263381	-2.3169
b ₁₁	-5.70794	2.5341572	-2.2772

Total de interacciones = 3
Total de evaluaciones de la función = 13

Tabla 5.11 Coeficientes del modelo cuadrático ajustado del peso de las plántulas de la variedad Atoyac a la putrescina.

fuerce	suma de cuadrados	g l	cuadrado medio	F	p
modelo	1467661.4	3	489220.5	203.8	* *
error	64822.578	27	2400.836		
total	1532484.0	30			
total corregido	83122.800	29			
R ²	0.957701				

Tabla 5.12 Análisis de varianza de la regresión total de la respuesta en el peso de las plántulas de la variedad Atoyac a la putrescina.

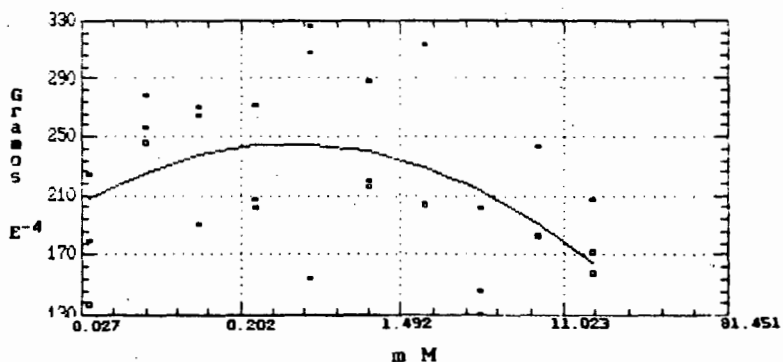


Figura 5.19 Regresión cuadrática ajustada de la respuesta en el peso de las plántulas de la variedad Atoyac a la putrescina.

variable	coeficiente	error estandar	F
b	179.364631	22.7815151	7.87325
b ₁	-18.351175	8.1864741	-2.24165
b ₁₁	-0.440016	4.2984581	-0.10237

Total de interacciones = 3

Total de evaluaciones de la función = 13

Tabla 5.13 Coeficientes del modelo cuadrático ajustado de la respuesta en el peso de las plántulas de la variedad Atoyac a la espermidina

fuerce	suma de cuadrados	g l	cuadrado medio	F	p
modelo	1858041.5	3	352680.5	51.1	*
error	196502.47	27	6907.50		
total	1244544.0	30			
total corregido	225917.87	29			
R ²	0.850144				

Tabla 5.14 Análisis de varianza de la regresión total de la respuesta en el peso de las plántulas de la variedad Atoyac a la espermidina.

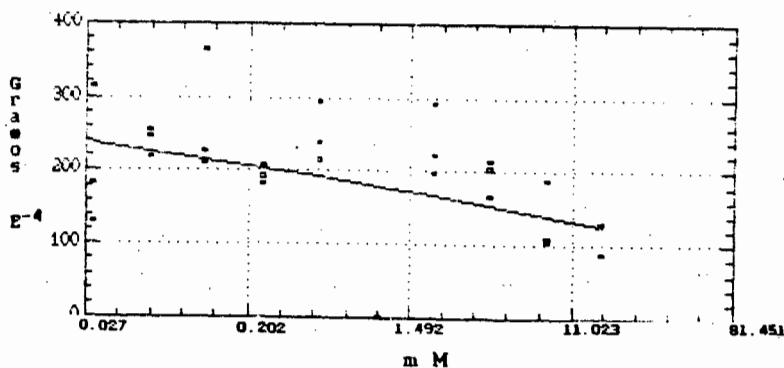


Figura 5.20 Regresión cuadrática ajustada de la respuesta en el peso de las plántulas de la variedad Atoyac a la espermidina.

variable	coeficiente	error estandar	F
b	188.379304	14.4485852	13.0379
b ₁	-38.961496	5.1920589	-7.5041
b ₁₁	-11.171503	2.7261856	-4.0979

Total de interacciones = 3
Total de evaluaciones de la función = 13

Tabla 5.15 Coeficientes del modelo cuadrático ajustado de la respuesta en el peso de las plántulas de la variedad Atoyac a la espermina.

f fuente	suma de cuadrados	g l	cuadrado medio	F	p
modelo	892240.21	3	297413.40	107.04	* *
error	75018.785	27	2778.474		
total	967259.00	30			
total corregido	236242.70	29			
R ²	0.922442				

Tabla 5.16 Análisis de varianza de la regresión total de la respuesta en el peso de las plántulas de la variedad Atoyac a la espermina.

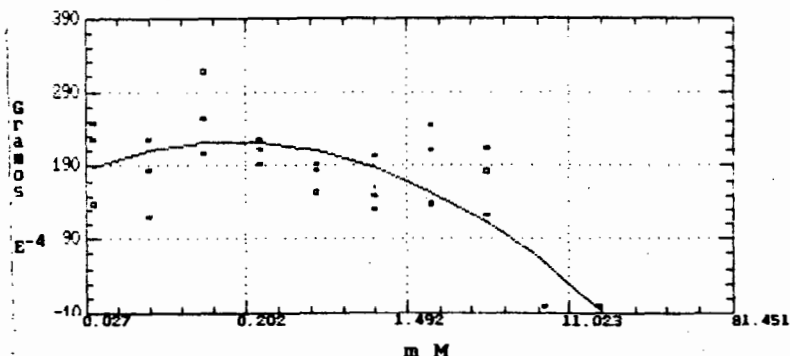


Figura 5.21 Regresión cuadrática ajustada de la respuesta en el peso de las plántulas de la variedad Atoyac a la espermina.

variable	coeficiente	error estandar	F
b	249.932017	21.5901451	11.5762
b ₁	-48.987894	7.7583586	-6.3142
b ₁₁	-5.175478	4.0736682	-1.2705

Total de interacciones = 3
 Total de evaluaciones de la función = 13

Tabla 5.17 Coeficientes del modelo cuadrático ajustado de la respuesta en el peso de la variedad Florida a la espermina.

fuerza	suma de cuadrados	g l	cuadrado medio	F	p
modelo	2077613.9	3	692538.0	111.6	**
error	167506.05	27	6203.93		
total	2245120.0	30			
total corregido	424716.67	29			
R ²	0.925391				

Tabla 5.18 Análisis de varianza de la regresión total de la respuesta en el peso de la variedad Florida a la espermina.

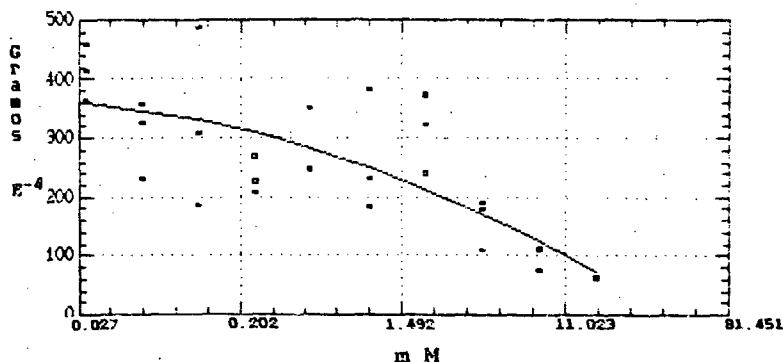


Figura 5.22 Regresión cuadrática ajustada de la respuesta en el peso de la variedad Florida a la espermina.

V.4.4 Efecto de poliaminas en la talla de las plántulas obtenidas de la germinación bajo estrés de sal en las variedades estudiadas.

La variedad Atoyac presentó una respuesta que se ajustó de manera significativa con $p < 0.05$, en todas las poliaminas utilizadas al modelo cuadrático de regresión, en la talla de las plántulas bajo estrés salino (Tablas 5.19-5.25, Figuras 5.23-5.25).

La respuesta de la variedad Florida en la talla de las plántulas obtenidas de la germinación bajo estrés de salinidad de esta variedad a las poliaminas espermidina y espermina se ajustó de manera significativa con $p < 0.05$ (Tabla 5.19, 5.26-5.29, Figuras 5.26 y 5.27).

La variedad Mesilla en la talla de las plántulas obtenidas de la germinación bajo estrés salino presentó una respuesta a la espermidina que se ajustó de manera significativa con $p < 0.1$ (Tablas 5.19, 5.30 y 5.31, Figura 5.28) al modelo cuadrático de regresión, siendo esta la única respuesta significativa de esta variedad al modelo de regresión utilizado para las poliaminas estudiadas.

	Putrescina	Espermidina	Espermina
Atoyac	**	**	**
Florida	ns	**	**
Mesilla	ns	*	ns

Probabilidad < 0.05 (**)

Probabilidad < 0.1 (**)

No significativo (ns)

Tabla 5.19 Nivel de significancia del ajuste a un modelo cuadrático por regresión del efecto de poliaminas sobre la talla de la plántulas bajo estrés de salinidad en las variedades estudiadas.



FACULTAD DE CIENCIAS
 HERBARIO
 HERPACUG

variable	coeficiente	error estandar	F
b	38.0421742	2.77416691	13.7130
b ₁	-2.7926701	0.99688916	-2.8014
b ₁₁	-1.7589999	0.52343491	-3.3605

Total de interacciones = 3

Total de evaluaciones de la función = 13

Tabla 5.20 Coeficientes del modelo cuadrático ajustado de la respuesta en la talla de la variedad Atoyac a la putrescina.

fuerce	suma de cuadrados	g l	cuadrado medio	F	p
modelo	31640.431	3	10546.810	102.96	* *
error	2765.5694	27	102.4285		
total	34406.000	30			
total corregido	4195.8667	29			
R ²	0.91962				

Tabla 5.21 Análisis de varianza de la regresión total de la respuesta en la talla de la variedad Atoyac a la putrescina.

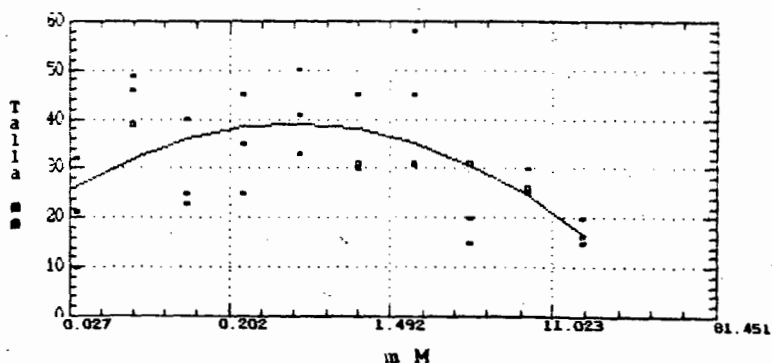


Figura 5.23 Regresión cuadrática ajustada de la respuesta en la talla de la variedad Atoyac a la putrescina.

variable	coeficiente	error estandar	F
b	29.8970683	4.29544889	6.96017
b ₁	-5.0505471	1.54355761	-3.27202
b ₁₁	-0.7397256	0.81047318	-0.91271

Total de interacciones = 3
 Total de evaluaciones de la función = 13

Tabla 5.22 Coeficientes del modelo cuadrático ajustado de la respuesta en la talla de la variedad Atoyac a la espermidina.

fuerce	suma de cuadrados	g l	cuadrado medio	F	p
modelo	27317.649	3	9105.883	37.08	**
error	6630.3506	27	245.5685		
total	33948.000	30			
total corregido	9294.6667	29			
R ²	0.804691				

Tabla 5.23 Análisis de varianza de la regresión total de la respuesta en la talla de la variedad Atoyac a la espermidina.

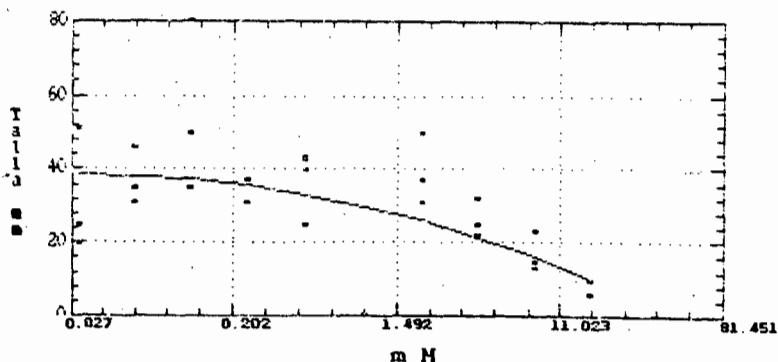


Figura 5.24 Regresión cuadrática ajustada de la respuesta en la talla de la variedad Atoyac a la espermidina.

variable	coeficiente error estandar		F
b	30.1357311	2.85943764	10.5390
b ₁	-6.3175890	1.02753092	-6.1483
b ₁₁	-2.0676925	0.53952392	-3.8324

Total de interacciones = 3
 Total de evaluaciones de la función = 13

Tabla 5.24 Coeficientes del modelo cuadrático ajustado de la respuesta en la talla de la variedad Atoyac a la espermina.

fuerce	suma de cuadrados	g l	cuadrado medio	F	p
modelo	21428.805	3	7142.935	65.64	**
error	2938.1950	27	108.8220		
total	24367.000	30			
total corregido	7326.1667	29			
R ²	0.879419				

Tabla 5.25 Análisis de varianza de la regresión total de la respuesta en la tala de la variedad Atoyac a la espermina.

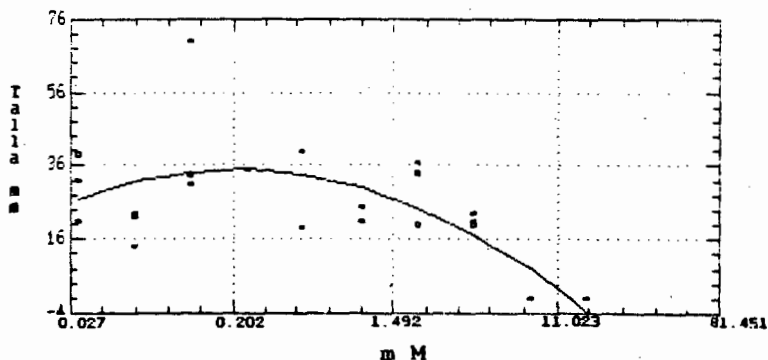


Figura 5.25 Regresión cuadrática ajustada de la respuesta en la talla de la variedad Atoyac a la espermina.

variable	coeficiente	error estandar	F
b	28.2610896	2.93295707	9.63570
b ₁	-3.2464019	1.05394996	-3.08022
b ₁₁	-0.8920364	0.55339572	-1.61193

Total de interacciones = 3
Total de evaluaciones de la función = 13

Tabla 5.26 Coeficientes del modelo cuadrático ajustado de la respuesta en la talla de la variedad Florida a la espermidina.

f fuente	suma de cuadrados	g l	cuadrado medio	F	p
modelo	20976.774	3	6992.258	61.07	* *
error	3091.2263	27	114.4899		
total	24068.000	30			
total corregido	4201.8667	29			
R ²	0.871563				

Tabla 5.27 Análisis de varianza de la regresión total de la respuesta en la talla de la variedad Florida a la espermidina.

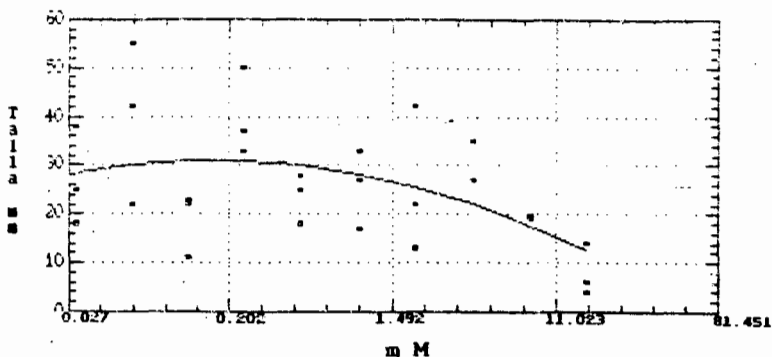


Figura 5.26 Regresión cuadrática ajustada de la respuesta en la talla de la variedad Florida a la espermidina.

variable	coeficiente	error estandar	F
b	24.7372414	2.04101945	12.1200
b ₁	-6.0799898	0.73343466	-8.2897
b ₁₁	-0.3602423	0.38510330	-0.9354

Total de interacciones = 3

Total de evaluaciones de la función = 13

Tabla 5.28 Coeficientes del modelo cuadrático ajustado de la respuesta en la talla de la variedad Florida a la espermina.

fuerce	suma de cuadrados	g l	cuadrado medio	F	p
modelo	23599.028	3	7866.343	141.8	**
error	1496.9720	27	55.4434		
total	25096.000	30			
total corregido	5639.4667	29			
R ²	0.94035				

Tabla 5.29 Análisis de varianza de la regresión total de la respuesta en la talla de la variedad Florida a la espermina.

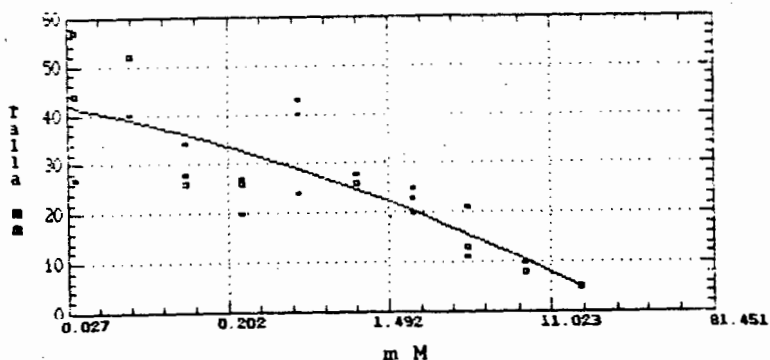


Figura 5.27 Regresión cuadrática ajustada de la respuesta en la talla de la variedad Florida a la espermina.

variable	coeficiente	error estandar	F
b	9.682597366	1.06060337	9.12968
b ₁	-0.46355640	0.49900011	-0.92897
b ₁₁	0.53567811	0.21532349	2.48778

Total de interacciones = 3
 Total de evaluaciones de la función = 13

Tabla 5.30 Coeficientes del modelo cuadrático ajustado de la respuesta en la talla de la variedad Mesilla a la espermidina.

fuerce	suma de cuadrados	g l	cuadrado medio	F	p
modelo	2439.1361	3	813.0454	96.729	*
error	100.86392	12	8.40533		
total	2540.0000	15			
total corregido	233.60000	14			
R ²	0.96029				

Tabla 5.31 Análisis de varianza de la regresión total de la respuesta en la talla de la variedad Mesilla a la espermidina.

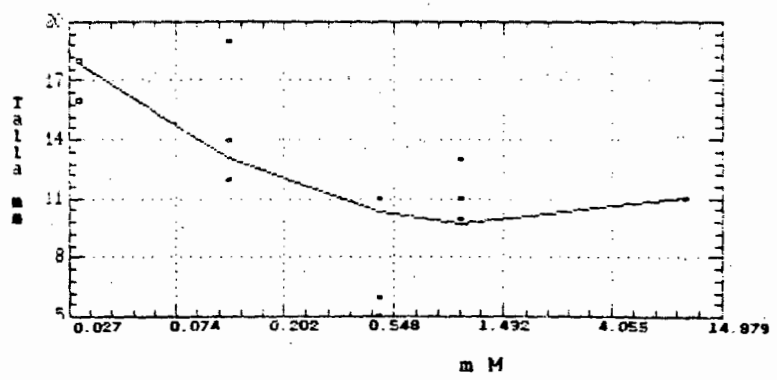


Figura 5.28 Regresión cuadrática ajustada de la respuesta en la talla de la variedad Mesilla a la espermidina.

V.4.5 Concentraciones óptimas de poliaminas

Utilizando el método de evaluación de puntos críticos, se encontraron concentraciones óptimas teóricas en los tratamientos con poliaminas que presentaron respuestas con ajuste significativo al modelo cuadrático de regresión, tanto en el aumento del número de semillas germinadas como en el aumento del peso y la talla de las plántulas obtenidas bajo estrés de salinidad. Estas concentraciones se encuentran en la tabla 5.32

	Germinación	Talla	Peso
ATOYAC			
Putrescina	0.8368	0.3796	0.4522
Espermidina	0.4747	9.41 E ⁻¹⁰	0.0329
Espermina	0.0276	0.1749	0.2171
FLORIDA			
Putrescina	-----	-----	-----
Espermidina	a	-----	0.1621
Espermina	-----	0.0088	0.0002
MESILLA			
Putrescina	-----	-----	-----
Espermidina	-----	-----	b
Espermina	-----	-----	-----

Tabla 5.32 Concentraciones óptimas teóricas dadas en milimolaridad de poliaminas para el aumento del número de semillas germinadas, el peso y la talla de las plántulas de Medicago sativa L. obtenidas bajo estrés de salinidad.

a y b, presentaron ajuste significativo, pero se obtuvieron mínimos (efecto tóxico).

VI. DISCUSION

Aún cuando se igualaron los potenciales osmóticos de los tratamientos de NaCl a los de PEG (Tabla 4.1), se encontró una respuesta diferente a cada tipo de estrés, en las variedades estudiadas. Esto es congruente con los resultados encontrados al analizar el contenido endógeno de poliaminas en diferentes variedades de trigo sometidas a estrés osmótico (sorbitol) y salino (NaCl) (László et al., 1990). La línea experimental 7-S-92 se vió favorecida en su germinación con el primer tratamiento de NaCl (0.016 M), sin embargo, su talla se vió afectada en todas las concentraciones de NaCl (Figura 5.5). Esto puede ser debido a que la tolerancia a la salinidad es una característica multigénica.

El hecho de que las poblaciones de alfalfa (excepto la variedad Florida) se vean favorecidas al germinar con 0.016 M de NaCl (Figura 5.4) puede ser debido a que el testigo (0 M de NaCl) no existe en condiciones naturales, ya que no es posible que existan suelos en los cuales el NaCl no esté presente. Además, probablemente el tener NaCl externo ayudó a las células de alfalfa a compensar el potencial osmótico por medio de la compartamentación de sal y por eso las plántulas se afectaron menos en presencia de NaCl que en el estrés de agua donde tuvieron el mismo potencial osmótico impuesto por el polietilenglicol 6000, pero no

tienen iones para compartimentizar. Este fenómeno ha sido observado en Atriplex griffithsii (Rodríguez-Garay, 1985). Aparentemente, la variedad Atoyac requiere de la presencia de NaCl para estimular su talla, ya que se vió que la aumenta con el primer tratamiento de NaCl (0.016 M, Figura 5.5).

La variedad regional, puede considerarse medianamente tolerante al estrés osmótico, debido a que su germinación fué mayor en tratamientos hasta con -0.679 MPa que en tratamientos sin estrés osmótico y se considera alto nivel de estrés un potencial osmótico de -1.0 a -2.0 MPa (Salisbury and Ross, 1978).

La relación lineal entre el porcentaje de raíces respecto a la talla total de la plántula y la concentración del agente estresante, encontrada para la variedad Atoyac (Figuras 5.7 y 5.8) indica que esta es la variedad que tiene una mejor respuesta morfológica a ambos tipos de estrés. La variedad Florida presentó un comportamiento similar (Figuras 5.9 y 5.10) debido probablemente a que las dos variedades se cultivan en ambientes parecidos, lugares donde la humedad no es muy abundante y probablemente sea una respuesta de adaptación al aumentar su raíz al aumentar la concentración del agente estresante externo. En cambio, la variedad Mesilla y la línea experimental 7-S-92 no presentan esta relación lineal entre el porcentaje de raíces con respecto a

la concentración del agente estresante (Figuras 5.11 a 5.14) esto debido probablemente a que se originaron bajo condiciones benignas (sin estrés).

Al analizar las concentraciones teóricas óptimas en la variedad Atoyac que fué la única que presentó respuestas con ajuste significativo tanto en su germinación como en su talla y en su peso, con cada una de las poliaminas utilizadas (Tablas 5.1, 5.10 y 5.19), se observó que se necesita una concentración mayor de putrescina para la germinación que para la talla y el peso (Tabla 5.32), esto es debido probablemente a que en la etapa de germinación es más difícil la penetración de poliaminas, además, en las plántulas se incrementa la concentración de poliaminas endógenas por lo que se requiere menor concentración exógena. Por otro lado, también se observó que se requiere mayor concentración de putrescina, que es de menor peso molecular que espermidina y espermina, tanto para la germinación como para la talla y para el peso.

Esta alta concentración teórica óptima encontrada para la putrescina es congruente con la biosíntesis de poliaminas ya que la putrescina es precursor de la espermidina y esta de la espermina (figura 2.1), además estas poliaminas son precursores de poliaminas no comunes las cuales se ha postulado ejercen un papel protector tanto en bacterias como en plantas adaptadas a ambientes extremos (Kuehn, 1990b).

La información obtenida en este trabajo puede ser útil en proyectos de mejoramiento mediante técnicas biotecnológicas

a través de las cuales es posible intentar selección de células y/o plantas sobreproductoras de poliaminas (endógenas) para producir a partir de estas líneas o plantas tolerantes a los tipos de estrés abiótico estudiados.

VII. CONCLUSIONES

- 1.- La variedad Atoyac es medianamente tolerante al estrés de salinidad y de sequía
- 2.- La respuesta al estrés de agua es diferente a la respuesta al estrés salino en las variedades estudiadas.
- 3.- Las concentraciones óptimas teóricas de las poliaminas utilizadas son distintas para la germinación, talla y peso de las variedades de Medicago sativa L. estudiadas.
- 4.- Se encontraron concentraciones óptimas teóricas de putrescina espermidina y espermidina para incrementar el número de semillas germinadas, el peso y la talla de las plántulas en la variedad Atoyac, bajo estrés de salinidad.
- 5.- En la variedad Florida se encontraron concentraciones óptimas teóricas para incrementar el peso de las plántulas obtenidas de la germinación bajo estrés salino con espermina y para incrementar la talla con espermidina y espermina.
- 6.- El efecto óptimo de la espermidina en la germinación bajo estrés salino de la variedad Florida parece estar en concentraciones más altas que las utilizadas.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Backlund VL, and RR Hoppes. (1984) Status of soil salinity in California. California Agriculture 38(10):8-9.
- Bagni N, and M Mengoli. (1986) Carrot cell lines adapted and resistant to putrescine and alfa-difluoromethylornithine
In: Caldarera C.M, Cló C, Guarnieri C (eds.) Biomedical Studies of Natural Polyamines. Italy.
- Biggar JW., DE Rolston ., DR Nielsen. (1984) Transport of salts by water. California Agriculture 38(10):10-11.
- Bliss RD., K Platt-Aloia ., WW Thomson. (1984) Effects of salt on cell membranes of germinating seeds. California Agriculture 38 (10):24-25.
- Castellanos A., FJ Cepeda ., JA De la Cruz., MJ Galo., MH González., J Maldonado., R Vales. (1987) Zonas áridas
Memorias del X Congreso de Botánica. Simposium Zonas áridas. Guadalajara, Jalisco.
- Estrada-Faudón E. (1983) Estudio demográfico de dos islas lacustres de la jurisdicción de Atoyac. Boletín del Instituto de Geografía y Estadística U. de G. 6(1):2-19.

- Flores HE., CM Protacio., MW Signs. (1989) Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. Recent. Adv. Phytochem. 23: 329-393
- Flowers TJ., PF Troke., AR Yeo. (1977) The mechanism of salt tolerance in halophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 89-121.
- Hamana K, and S Matsuzaki. (1982) Widespread occurrence of norspermidine and norspermine in eukaryotic algae. J. Biochem, 91: 1321-1328.
- Hasegawa PM., RA Bressan., S Handa., AK Handa. (1984) Cellular mechanisms of tolerance to water stress. Hort Science 19(3):371-375.
- Heby O (1986) Putrescine, Spermidine and Spermine. Int. Union Physiol. Sci. Volumen 1
- Hughes HD (Ed) (1981) Ferrajes. La Ciencia de la Agricultura Basada en la Producción de pastos. Ed. Continental México. p.p. 300-305.
- Kaur-Sawhney R., LM Shih., T Cegielska., AW Galston. (1982) FEBS Lett. 145: 345-349

Kneifel H., KP Stotter., KR Andreeson., H Wiegel., H Konig.,
SM Schoberthu. (1986) Distribution of polyamines in
representative species of archaetobacteria. System Appl
Microbiol 7: 241-245.

Kramer PJ, (1980) Drought, stress, and the origin of
adaptations In: Turner NC and Kramer PJ (eds). Adaptation
of Plant to Water and High Temperature Stress. Wiley
Press USA p.p. 7-20.

Kuehn GD., S Bagga., B Rodriguez-Garay., G Phillips. (1990a)
Biosynthesis of Uncommon polyamines in higer plants and
their relationship to abiotic stress responses In:
Flores HE, Arteca RN, Shannon JC (eds). Polyamines and
Ethylene: Biochemistry, Physiology, and Interactions.
Current Topics in Plant Physiology: An American Society
of Plant Physiologist Series Volume 5 : 190-202.

Kuhen GD., B Rodriguez-Garay., S Bagga., GC Phillips. (1990
b) Novel ocurrence of uncommon polyamines in higer
plants. Plant Physiol (94):855-857.

László E., S Trivedi., K Takeda., H Matsumoto. (1990)
Effects of osmotic and salt stresses on the acumulation
of polyamines in leaf segements from wheat varieties
differing in salt and drought tolerance. J. Plant
Physiol. 137: 165-168.

Lauchi A, and E Epstein. (1984) Mechanisms of salt tolerance in plants. California Agriculture 38(10): 18-20

Lucarini C, and RS Sangwan. (1987) Changes in polyamines, protein and ionics contents during *in vitro* salt-stressed androgenesis of *Nicotiana tabacum*. Biochem Physiol Pflanzen 182: 57-66.

Meijer EGM, and J Simmonds. (1988) Polyamine levels in relation to growth and somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa* L. Journal of Experimental Botany 39(203):787-794.

Oshima T (1978) Novel polyamines of extremely thermophilic bacteria In: Freidman SM 9ed) Biochemistry of Thermophily. Academic Press, New York, pp 211-220

Pfaller MA., J Riley., T Gerarden. (1988) Polyamine depletion and growth inhibition in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by alfa-difluoromethylornitine and cyclohexylamine. Journal of Medical and Veterinary Mycology 26(2): 119-126.

Phillips GC. (1987) Somatic cell selection criteria for water use efficiency using genetically differential alfalfas. Technical completion report. Proyect. No. 1423650. New México State University.

- Prakash L., P John., GM Nair., G Prathapasenan. (1988)
Effect of spermidine and methylglyoxal-bis (guanyl-
hydrazone)(MGBG) on *In vitro* pollen germination and tube
growth in Catharanthus roseus. Ann Botany 61(3):373-375.
- Rodriguez-Garay B (1985) Pollen expressed heat tolerance and
its correlation to drouht and salt tolerance in cotton
cell cultures. Ph. D. Diss. New Mexico State Univ., Las
Cruces (Diss. Abstr. 86-06133)
- Rodriguez-Garay B., GC Phillips., GD Kuehn. (1989) Detection
of norspermidine and norspermine in Medicago sativa L.
(Alfalfa). Plant. Physiol. 89, 525-529.
- Rolston DE., JW Biggar., DR Nielsen. (1984) Effect of salt
on soils. California Agriculture 38(10): 11-13.
- Salisbury FB., and CW Ross (1978) Plant Physiology.
Wadsworth Publishing Company USA pp. 475-476.
- Sethi U., A Basu., Guha-Mukherjee (1988) Control of cell
proliferation and diferentiation by regulating polyamine
biosynthesis in cultures of Brassica and its correlation
with glyoxalase-I activity. Plant Sci. 56: 167-175.

Terry N, and LJ Waldron. (1984) Salinity, photosynthesis and leaf growth. California Agriculture 38 (10):15-17

Slocum RD., R Kaur-Sawhny., AW Galston. (1984) The physiology and biochemistry of polyamines in plants Arch. Biochem. Biophys. 235: 283-303

Schimke RT (1984) Gene amplification in cultured animal cells. Cell 37: 705-713.

Stark GR, and GM Wahl. (1984) Gene Amplification. Annv. Rev. Biochem. 53: 447-491.

Thimann KV (1980) (ed) Senescence in Plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 85-115

Venne RV (1984) Preface. California Agriculture 38(10):3

Young ND, and Galston AW (1983) Are polyamines transported in etiolated peas? Plant Physiol. 73: 912-914

IX. APENDICES

IX.1 Apendice I.- Metodología seguida en cada repetición

1) Impregnado del papel filtro previamente esterilizado en autoclave y colocado en el fondo de una caja de petri desechable, con 3 ml de la solución del tratamiento empleado, utilizando una pipeta estéril.

2) Colocación de 25 semillas desinfectadas sobre el papel filtro, utilizando pinzas desinfectadas mediante flameado con alcohol etílico industrial.

3) Rotulado de la caja con fecha, población de Alfalfa y tipo de tratamiento, utilizando un marcador de tinta indeleble.

4) Sellado de la caja con plástico adherente.

5) Incubación durante 5 días en un incubador con temperatura constante de 25°C. con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

6) Conteo del número de semillas germinadas en cada caja de petri.

7) Pesado de las plántulas obtenidas, utilizando balanza analítica y de la talla tanto del epicótilo como del hipocótilo, empleando papel milimétrico y un microscopio estereoscópico.

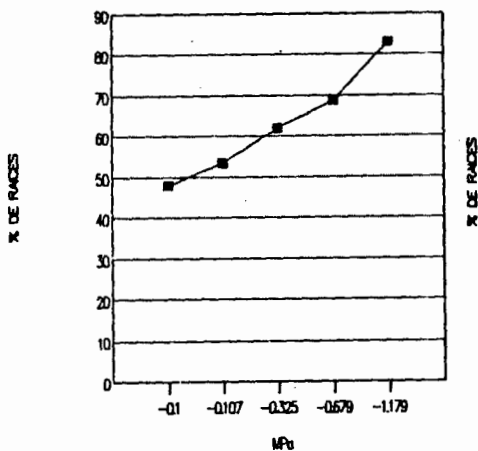
15) Elaboración de Graficas y análisis de los resultados.

Desinfección de las semillas

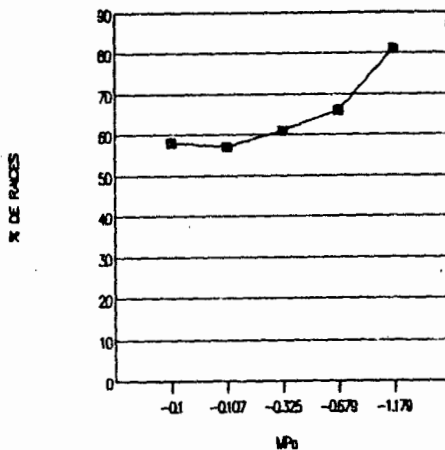
- 1) Introducción de las semillas dentro de una malla fina de plástico.
- 2) Lavado con jabón palmolive líquido y agua corriente.
- 3) Traslado de la malla con las semillas lavadas a una campana de flujo laminar para mantener la asepsia.
- 4) Eliminación de la cubierta serosa de las semillas introduciendo la malla en un frasco de cristal con alcohol etílico industrial durante 10 segundos, sobre un agitador magnético con agitación moderada.
- 5) Desinfección de las semillas introduciendo la malla a un frasco con cloralex al 50% (hipoclorito de sodio al 1%) durante 5 minutos, manteniendo la agitación magnética.
- 6) Eliminación del cloralex mediante tres enjuages con agua bidestilada estéril utilizando un frasco por enjuage. El primer enjuage durante 4 minutos y los dos restantes durante 3 minutos, todos sobre el agitador magnético.
- 7) Secado de las semillas con el flujo laminar de la campana sobre una tapa de caja de petri desechable con papel filtro en el fondo para absorber el exceso de agua y manejar las semillas con facilidad utilizando pinzas flameadas.

IX.2 Apéndice II.- Relación en porcentaje de la raíz al aumentar la concentración de NaCl en las variedades de *Medicago sativa* L. estudiadas.

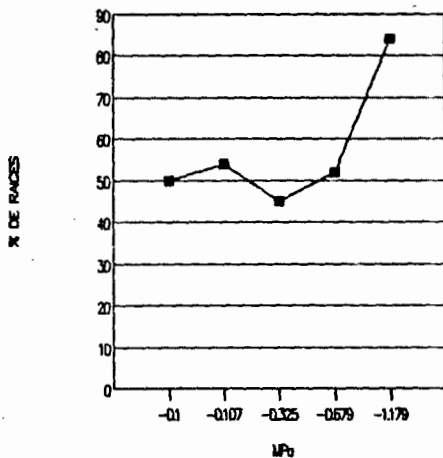
VARIEDAD ATOYAC



VARIEDAD FLORIDA



VARIEDAD MESILLA



VARIEDAD 7-S-92

