

31
2Ej.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

"PARTICIPACION DE LA NITRATO-REDUCTASA
EN LA EXPRESION DEL VIGOR DE PLANTULAS
DE TRIGO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Q U I M I C O
P R E S E N T A
ITZIA IRENE PADILLA MARTINEZ



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

México, D. F.

1987.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

CONTENIDO	PAGS.
INDICE	1
INDICE DE TABLAS	6
INDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE DIAGRAMAS	8
RESUMEN	9
1) INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	11
1.1 DETERIORO DE SEMILLAS Y VIGOR DE LA PLANTULA	13
1.2 EVENTOS BIOQUIMICOS Y FISIOLÓGICOS QUE PARTICIPAN EN LA GERMINACION DE CEREALES	14
1.2.1 Hidratación y Respiración	14
1.2.2 Biosíntesis de Macromoléculas	16
1.3 EVENTOS BIOQUIMICOS Y FISIOLÓGICOS TEMPRANOS EN LA IMBIBICION, QUE SE DAÑAN DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.	17
1.3.1 Respiración y síntesis de ATP	18
1.3.2 Biosíntesis de Macromoléculas	18
1.3.3 Integridad Membranal	20
1.4 MOVILIZACION DE LAS RESERVAS EN CEREALES	21
1.4.1 Estructura y Composición Química de la semilla de cereal.	22
1.4.2 Mecanismo de Control de la Movilización de Reserva.	22
1.4.2.1 Movilización de Carbohidratos	23
1.4.2.2 Movilización de Proteínas	24
1.4.2.3 Movilización de Reservas Menores	25

1.5. RESERVAS ALIMENTICIAS Y SU RELACION CON LA EXPRESION DEL VIGOR.	26
1.6. CAPACITACION AUTOTROFICA DE LA PLANTULA Y SU RELACION CON LA EXPRESION DEL VIGOR.	27
1.6.1 Bioquímica de la Adquisición de la autotrofia.	28
1.6.2 Interrelación de la fototrofia y azootrofia durante la capacitación autotrófica.	30
1.7 HIPOTESIS	31
1.8 OBJETIVOS	32
 2) MATERIALES Y METODOS	 33
2.1 REACTIVOS UTILIZADOS	33
2.2 EQUIPO	34
2.3 MATERIAL BIOLÓGICO	34
2.4 METODOLOGIA DEL DETERIORO DE SEMILLAS	34
2.4.1 Deterioro Acelerado	35
2.4.2 Metodología para la Optimización de las Condiciones de Deterioro	36
2.5 METODOLOGIA PARA LA EVALUACION DEL ESTADO FINAL DE LA SEMILLA SOMETIDA A TRATAMIENTO DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO.	39
2.5.1 Contenido de Humedad de la semilla	39
2.5.2 Micoflora	39
2.5.3 Medición de la Viabilidad y Velocidad de Germinación	40

2.5.4	Determinación del Vigor de las Semillas	40
2.6	METODO DE SIEMBRA	40
2.7	COSECHA DEL MATERIAL BIOLÓGICO	41
2.8	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA NITRATO REDUCTASA	43
2.8.1	Obtención del Extracto Enzimático para la Determinación de la ANR.	43
2.8.2	Filtración Molecular del Extracto Enzi- mático Crudo.	43
2.8.3	Ensayo de la Actividad de la Nitrato Reductasa	46
2.9	OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES PARA MEDIR LA ANR	49
2.9.1	Efecto del Desalado en la ANR	49
2.9.2	Efecto del Tiempo de Iluminación en la ANR	51
2.10	DETERMINACIONES ANALITICAS	51
2.10.1	Determinación de Nitritos	51
2.10.2	Determinación de Proteínas por el Método de Peterson.	53
2.10.3	Determinación de Nitratos	56
3)	RESULTADOS	62
3.1	RESULTADOS DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO	62
3.1.1	Efecto del Contenido de Humedad de la semilla en la Velocidad de Germinación	62
3.1.2	Selección de las Condiciones de Almace- namiento para la Obtención de Semilla de Trigo de Bajo Vigor.	64
3.1.2.1	Experimento I	65
3.1.2.2	Experimento II	67

3.1.2.3	Experimento III	69
3.1.3	Optimización de las Condiciones de Almacenamiento para Obtener Semillas Deterioradas	72
3.2.	RESULTADOS BIOQUIMICOS Y FISIOLÓGICOS	76
3.2.1	Velocidad de Movilización de Reservas en Plántulas Control y de Bajo Vigor	76
3.2.1.1	Cinética de Movilización de las Reservas en Plántulas de Trigo Control y de Bajo Vigor.	76
3.2.1.2	Efecto de las sales Minerales en la Cinética de Crecimiento de Plántulas de Trigo Control y de Bajo Vigor.	78
3.2.2	Efecto del Deterioro en la Integración del Metabolismo Nitrogenado al Metabolismo Hidrocarbonado.	84
3.2.2.1	Efecto del Deterioro en la Síntesis de Proteína Heterotrófica	84
3.2.2.2	Efecto del Deterioro en la Síntesis de Proteína Autotrófica	85
3.2.3	Actividad de la NR	89
3.2.3.1	Efecto del Deterioro en la Capacidad de Inducción de ANR y Captación de Nitratos	89
3.2.3.2	Efecto del Deterioro en la Capacidad de Acumulación de ANR y de Nitratos.	92

4) DISCUSION	96
5) CONCLUSIONES	103
6) PERSPECTIVAS	104
BIBLIOGRAFIA	105

I N D I C E D E T A B L A S .

TABLA	PAGS.
3.1 EFECTO DEL SECADO EN LA VIABILIDAD Y VELOCIDAD DE GERMINACION DE LA SEMILLA DE TRIGO	63
3.2 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO I	66
3.3 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO II	68
3.4 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO III	70
3.5 EFECTO DEL TIEMPO DE DETERIORO EN LA VELOCIDAD DE GERMINACION, VIABILIDAD Y VIGOR DE SEMILLA DETERIORADA POR EL METODO A.	73
3.6 EFECTO DEL TIEMPO DE DETERIORO EN LA VELOCIDAD DE GERMINACION, VIABILIDAD Y VIGOR DE SEMILLA DETERIORADA POR EL METODO B.	74

I N D I C E D E F I G U R A S

FIGURA	PAGS.
2.1 EFECTO DEL DESALADO EN LA INDUCCION DE ANR	50
2.2 CINETICA DE ACTIVIDAD LUMINOSA DE LA NR	52
2.3 CURVA PATRON DE NITRITOS	55
2.4 CURVA PATRON DE PROTEINAS	58
2.5 CURVA PATRON DE NITRATOS	61
3.1 CINETICA DE MOVILIZACION DE RESERVAS	77
3.2 EFECTO DE LAS SALES MINERALES EN EL CRECIMIENTO DE PLANTULAS DE TRIGO CONTROL	80
3.3 EFECTO DE LAS SALES MINERALES EN EL CRECIMIENTO DE PLANTULAS DE TRIGO DE BAJO VIGOR	81
3.4 CINETICA DE CRECIMIENTO DE PLANTULAS DE TRIGO REGADAS CON Hg- NO ₃ ⁻	82
3.5 CINETICA DE CRECIMIENTO DE PLANTULAS DE TRIGO REGADAS CON Hg + NO ₃ ⁻	83
3.6 VARIACION EN EL CONTENIDO DE PROTEINA HETEROTROFI- CA EN CANOPIAS CONTROL Y DE BAJO VIGOR	86
3.7 VARIACION EN EL CONTENIDO DE PROTEINA AUTOTROFICA EN PLANTULAS DE TRIGO, CON LA EDAD.	88
3.8 CINETICA DE INDUCCION DE ANR	90
3.9 VARIACION DE LA CAPACIDAD DE TOMA DE NO ₃ ⁻ CON LA EDAD DE LA PLANTULA	91
3.10 CINETICA DE ACUMULACION DE ANR	93
3.11 ONTOGENIA DE ACUMULACION DE NO ₃ ⁻	95

INDICE DE DIAGRAMAS

DIAGRAMA	PAGS.
2.1 DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE DETERIORO ACELERADO	37
2.2 METODOS A Y B PARA DETERIORO ACELERADO	38
2.3 METODO DE SIEMBRA	42
2.4 COSECHA DEL MATERIAL BIOLOGICO	44
2.5 OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO CRUDO	45
2.6 FILTRACION MOLECULAR DEL EXTRACTO ENZIMATICO CRUDO	47
2.7 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA NITRATO REDUCTASA	48
2.8 DETERMINACION DE NITRITOS	54
2.9 DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE PETERSON	57
2.10 DETERMINACION DE NITRATOS	60

RESUMEN

El envejecimiento acelerado de las semillas, ha sido ampliamente utilizado como herramienta en la investigación de los parámetros que afectan la calidad de las semillas en el almacén y entre otras consecuencias, disminuye el vigor de las plántulas. Las plántulas de bajo vigor, manifiestan una menor capacidad de crecimiento heterotrófico.

Durante el período de movilización de las reservas de la semilla, el crecimiento depende de la adecuada asimilación y movilización de las reservas almacenadas en el endospermo y la plántula se capacita para convertirse en un organismo autótrofo. Dado el paralelismo entre estos dos procesos es de esperarse que ambos sean interdependientes. Para establecer la relación existente entre ellos, se estudió la eficiencia de las plántulas control y de bajo vigor para movilizar sus reservas, así como la capacidad que presentan ambos sistemas para asimilar el CO_2 del aire (fototrofia) y el nitrógeno inorgánico (azeotrofia).

En este trabajo se obtuvo semilla deteriorada de alta viabilidad por envejecimiento acelerado y que dió origen a plántulas de bajo vigor. Estas manifestaron una menor acumulación de peso seco respecto al control, así como una menor capacidad de movilización de las reservas. Los patrones de crecimiento, en ambos casos se modificaron a partir del riego con solución de Hogland suplementada o no con nitratos.

La capacidad de síntesis de proteínas en ambos sistemas se mostró similar aún cuando la cantidad de proteína sintetizada al suplementar el medio de crecimiento con NO_3^- siempre fue menor en canopias de bajo

vigor. Esta deficiencia parece deberse a un menor aporte de nitrógeno reducido, ya que la actividad de nitrato reductasa (ANR) tanto inducida como acumulada, siempre fue menor en canopias de bajo vigor. La menor ANR fue acompañada de una menor capacidad de toma y acumulación de NO_3^- , lo que sugirió que el tratamiento de envejecimiento acelerado podría haber dañado el sistema transportador y/o de toma activa de NO_3^- .

Los resultados mostraron la existencia de una correlación entre el proceso de capacitación autotrófica y la movilización de reservas.

1) INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.

La semilla es el ente biológico por excelencia mediante el cual la mayoría de las plantas se propagan y aseguran su supervivencia. La semilla está capacitada funcional y estructuralmente para permitir que la nueva plántula en estado embrionario germine y se desarrolle a partir de los materiales almacenados en sus tejidos de reserva, hasta establecerse exitosamente como un organismo autótrofo.

La semilla como cualquier organismo vivo, con el tiempo sufre un proceso de envejecimiento o senescencia que conlleva cierto deterioro bioquímico y fisiológico que se evidencia durante la germinación y el crecimiento de la plántula (40,48). Este proceso es acelerado por el almacenamiento de la semilla en condiciones adversas (i.e. alta humedad relativa y temperatura) (7,11,43,44,48).

El deterioro de semillas durante el almacenamiento, puede producir entre otros efectos, una disminución en el vigor de la plántula (11,23). El vigor, se define como la capacidad de una plántula para crecer y desarrollarse hasta establecerse como organismo autótrofo (23). Generalmente, el vigor persiste durante todo el ciclo de vida de la planta y se manifiesta en el rendimiento de la cosecha (44). Sin embargo, evaluar el vigor en la madurez de la planta resulta un procedimiento lento y costoso, además dada la importancia del vigor en el establecimiento de la plántula, la mayor parte de las investigaciones se han concentrado en la expresión del vigor durante la germinación y desarrollo temprano de la planta. En términos bioquímicos, se han hecho intentos para relacionar el vigor de un lote de semillas con sus niveles de ATP (8) y de síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (1,11,45), durante las primeras horas de imbibición.

Sin embargo, el hecho de que la semilla germine (protuya

radícula), no garantiza que las plántulas tengan el vigor para establecerse como un organismo autótrofo (11,23). Además, existe evidencia que sugiere que la germinabilidad y la menor capacidad de crecimiento de las plántulas de bajo vigor, son eventos íntimamente relacionados pero regulados por mecanismos que operan independientemente durante el deterioro (1,48).

Existen algunos estudios sobre los eventos bioquímico-fisiológicos involucrados en la adquisición de la autotrofia (14,50), sin embargo, ha habido poco trabajo enfocado a relacionar esta última con el vigor de la plántula (23).

En la mayor parte de los trabajos, se considera alcanzada la autotrofia cuando el aparato fotosintético ha madurado y es capaz de fotosintetizar (fototrofia), midiendo la incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ (35) y la actividad de algunas de las enzimas involucradas, como la RuBPCasa (49) y la PEPCase (14,49).

El proceso de reducción del nitrato no se ha tomado en cuenta en los estudios de capacitación autotrófica, ya que se ha demostrado que en tan solo 26 h después de iniciada la imbibición de la semilla en presencia de nitratos (19) se induce la actividad de la Nitrato Reductasa (NR), primera enzima responsable de la reducción del nitrato y reguladora de la velocidad del proceso (12,30,31,37,49). Además, en los trabajos donde se ha estudiado la adquisición de la autotrofia, las plántulas han sido adicionadas de nitrato exógeno, por lo que no se ha establecido si la reducción del nitrato y la capacitación autotrófica son independientes o no.

Recientemente, determinando la actividad de la NR y la cantidad de proteína soluble, Vela y Bernal-Lugo (50), sugieren que el proceso

de reducción del nitrógeno (azeotrofia), juega un papel importante en la adquisición de la autotrofia.

En este trabajo utilizando el modelo de envejecimiento acelerado para obtener semilla deteriorada que dé origen a plántulas de bajo vigor, trataremos de establecer el papel del proceso de reducción del nitrato en el establecimiento autotrófico de plántulas de trigo de alto (control) y bajo vigor.

En las páginas siguientes se presenta al lector en forma breve, la información que requiere para la mejor comprensión del tema.

1.1 DETERIORO DE SEMILLAS Y VIGOR DE LA PLANTULA.

Como cualquier organismo vivo, las semillas con el transcurso del tiempo sufren un proceso de envejecimiento o senescencia que comienza en el momento que alcanzan la madurez en la planta madre (1,40) y que termina en la muerte ó pérdida de la viabilidad (1,11,43). El vigor fisiológico considerado como el máximo potencial de establecimiento de la plántula (11,23,40), también disminuya desde un máximo en la maduración hasta cero, cuando la semilla muere (40). Por lo tanto, el envejecimiento de la semilla ocasiona un deterioro de la misma, que se manifiesta desde un vigor disminuído hasta la pérdida total de la viabilidad.

El envejecimiento de la semilla en forma natural, es usualmente un proceso lento y gradual, que conlleva un deterioro paulatino tanto en la morfología como en la bioquímica y fisiología de las semillas (1,11). Se ha observado que este proceso se ve modificado por las condiciones de almacenamiento. Actualmente, se ha logrado un envejecimiento acelerado de la semilla sometiénola a altas presiones de oxígeno, temperatura y humedades relativas (1,11,17,22,43,48).

El modelo de envejecimiento acelerado como herramienta de investigación, presenta ciertas ventajas sobre el envejecimiento natural: 1) el tiempo requerido para obtener semilla deteriorada, disminuye notablemente (23); 2) se logra una mayor uniformidad en el vigor de un lote de semillas (40); 3) es representativo del envejecimiento natural, salvo en condiciones muy severas de almacenamiento (11); y 4) se puede pronosticar la secuencia de eventos involucrados en el deterioro (23).

Pese a estas ventajas, existe en la literatura evidencia de que algunos eventos bioquímicos involucrados en la germinación, se ven afectados de diferente manera cuando el envejecimiento es acelerado o natural (11,44). Sin embargo, ya que el vigor de la plántula se manifiesta después de la germinación (23,40,48), el modelo de envejecimiento acelerado sigue siendo adecuado para el desarrollo de este trabajo.

1.2 EVENTOS BIOQUIMICOS Y FISIOLOGICOS QUE PARTICIPAN EN LA GERMINACION DE CEREALES.

Los eventos que se suceden en el embrión y que conducen a la protusión radicular los llamaremos eventos bioquímico-fisiológicos que participan en la germinación. A continuación se expondrá un breve panorama de lo hasta ahora conocido al respecto tanto en semilla control como en deteriorada.

1.2.1 Hidratación y Respiración.

La hidratación de la semilla se lleva a cabo con la disminución en la energía libre del sistema, ya que la semilla tiene un potencial osmótico muy negativo (22). La semilla embebe agua en tres fases, una fase intermedia, estacionaria que culmina con la protusión radicular y

que separa una fase de imbibición inicial con rápida ganancia de agua de otra de crecimiento radicular (4,7).

La elongación celular en tallos y coleoptilos, se debe a la acción acidificante de la pared celular promovida por las auxinas. Para ello, se requiere de una síntesis continua de proteínas (enzimas y componentes de pared celular) y de la producción de energía (7). Por similitud con los sistemas anteriores, se ha sugerido que los eventos que suceden durante la imbibición y que culminan con la germinación, conducen al establecimiento integral de las maquinarias productoras de energía y macromoléculas que se requieren para la elongación radicular (germinación) (7).

Durante la germinación de embriones de lechuga y trigo, se ha observado que la cantidad de ATP aumenta rápidamente durante la primera hora de imbibición, con una concomitante disminución en la cantidad de ADP y AMP y un aumento en la síntesis de proteínas (8).

La producción de "novo" de ATP parece estar relacionada con la glucólisis o la vía de las pentosas y no con la fosforilación oxidativa, ya que en estos estadios, las mitocondrias son deficientes en citocromo-c y no tienen acoplada la fosforilación a la respiración (4).

Aunque la primera fase de hidratación la logran tanto semillas viables como no viables, se ha demostrado que en esta primera etapa la respiración debe ser lo suficientemente rápida para aportar la energía necesaria en la hidratación y alargamiento ordenado de las estructuras del eje embrionario (7).

El reestablecimiento de la integridad membranal perdida durante la deshidratación natural de la semilla se adquiere durante la

imbibición, permitiendo que las membranas adquirieran su permeabilidad selectiva natural y se establezca la recompartimentalización de los eventos celulares.

1.2.2 Biosíntesis de Macromoléculas.

Proteínas y RNA.

En ejes embrionarios disectados de arroz, frijol y trigo, se ha observado que la síntesis de proteínas comienza de 30 a 60 minutos después de iniciada la imbibición. En embriones de trigo seco se han encontrado los componentes citoplasmáticos esenciales para la síntesis de proteínas (8), como RNA polimerasa dependiente de DNA que cataliza la síntesis de RNA inmediatamente después de iniciada la imbibición. Asimismo, el t-RNA está presente en exceso para sustentar la síntesis de proteínas.

Si bien la síntesis de m-RNA se observa en la etapa temprana de la imbibición, se ha sugerido que este m-RNA no es necesario para dirigir la síntesis de proteínas durante los primeros 40 minutos de iniciada la imbibición, sino que en esta etapa la síntesis es dirigida por un m-RNA previamente guardado en el embrión de la semilla seca (45,48). Se cree que este m-RNA codifique para proteínas ribosomales, ya que éstas son producidas abundantemente durante la primera hora de imbibición (13). La etapa posterior a los primeros 40 minutos de imbibición, requiere de la síntesis de "novo" de m-RNA. También se ha demostrado que el aumento en la actividad de la síntesis de proteínas es un evento indispensable para la germinación (8,11).

DNA.

El DNA es una molécula de gran importancia biológica, ya que en ella se encuentra codificada la información genética de los organismos

vivos. Existen dos tipos de síntesis de DNA, la reparativa y la replicativa. La síntesis reparativa, tiene como finalidad reestablecer la integridad del DNA antes de su replicación. En semilla seca, se ha observado que el DNA se encuentra dañado debido a los factores físicos, químicos y ambientales a los que está expuesto durante el almacenamiento previo a la siembra y que le hacen perder su integridad (4). Este daño tiene que ser reparado en los primeros estadios de la imbibición, para asegurar la eficiencia del templado en la síntesis de proteínas y la conservación del genoma. Dada la importancia del DNA se ha sugerido que si el daño causado al mismo es mayor que su capacidad de reparación, la semilla pierde su viabilidad (4).

Se sabe que la replicación del DNA ocurre después de la protusión de la radícula, ya que la protusión es dependiente únicamente del alargamiento celular (7). Sin embargo, se ha encontrado que la actividad de ciertas enzimas involucradas en la replicación del DNA, como la Timidina quinasa y la DNA polimerasa, se incrementan durante las primeras horas de imbibición, ésta última por síntesis de "novo" (7).

1.3 EVENTOS BIOQUIMICOS Y FISIOLÓGICOS TEMPRANOS EN LA IMBIBICIÓN, QUE SE DAÑAN DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.

El panorama hasta aquí expuesto, nos da una visión clara de la importancia de los eventos bioquímicos tempranos en la imbibición, que conducen a una germinación exitosa. Si alguno de los procesos anteriores se dañan o no se dan en el espacio y tiempo adecuados, conducirán a la pérdida de germinabilidad o viabilidad de la semilla. A continuación se expone un breve panorama de la forma y magnitud en que estos procesos se dañan tanto por el envejecimiento natural como artificial.

1.3.1 Respiración y Síntesis de ATP.

Las semillas deterioradas presentan altos valores de cocientes respiratorios ($R.Q > 1$) en las etapas tempranas de imbibición (1). Estos altos valores de R.Q. pueden deberse a dos factores: un aumento en la evolución de CO_2 o una reducción en la cantidad de oxígeno tomado. El aumento en la evolución de CO_2 se presenta en semilla con poco grado de deterioro (antes de que disminuya la germinación), mientras que el menor consumo de oxígeno se presenta en grados avanzados de deterioro (23).

Abdul-Baki (1) propone que el aumento en la evolución de CO_2 no proviene de la oxidación de la glucosa, ya que experimentos realizados con ^{14}C -glucosa demostraron que ésta es utilizada a menor velocidad por las semillas deterioradas que las normales. Sin embargo, Bewley y Black (11) contraponen que los experimentos realizados por Abdul-Baki, no toman en cuenta la posible dilución de la ^{14}C -glucosa que resulta de la mayor cantidad de azúcares solubles presentes en semilla deteriorada y que dan la apariencia de disminuir la velocidad de consumo de la ^{14}C -glucosa por el embrión de semilla deteriorada.

También se ha encontrado que la capacidad de síntesis de ATP en las etapas tempranas de la imbibición se puede correlacionar directamente con la pérdida de la viabilidad de la semilla (1,8).

1.3.2 Biosíntesis de Macromoléculas.

Proteínas y RNA.

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de proteínas es un requisito indispensable para la germinación, por lo tanto, cualquier falla en el establecimiento integral de la síntesis de proteínas funcionales durante los estadios tempranos de la imbibición, ocasiona

nará la pérdida de viabilidad de la semilla.

Se ha encontrado que embriones disectados de semilla deteriorada de arroz, chícharo, soya y avena, incorporan una menor cantidad de aminoácidos marcados durante la imbibición (1,11). Asimismo, en poblaciones deterioradas de diversas semillas de las cuales se eliminaron las semillas muertas, se observa que la síntesis de proteínas de los individuos vivos disminuye con la pérdida de la germinabilidad (11).

Al parecer, la síntesis de proteínas se encuentra dañada tanto a nivel de traducción, como de transcripción. A nivel de traducción, se detecta una menor actividad de los factores de elongación 1 y 2 EF-1 y EF-2 (4,11), lo que sugiere un daño estructural en la maquinaria sintetizadora de proteínas (4).

La pérdida de la viabilidad asociada a una menor velocidad de síntesis de proteínas durante las primeras horas de imbibición, parece deberse al hecho de que el m-RNA guardado en el embrión y requerido para dirigir la síntesis temprana de proteínas, es degradado o modificado a medida que la semilla envejece (4, 45).

En cuanto a la síntesis de RNA, molécula clave en el proceso de transcripción de la información codificada en el DNA, se ha encontrado tanto en embriones de trigo (45) como de centeno (4), que la velocidad de síntesis de RNA durante las primeras horas de imbibición, disminuye a medida que el porcentaje de viabilidad del lote de semillas disminuye también. Hasta ahora, no se ha esclarecido si esta disminución en la síntesis de RNA es debida a una menor actividad en la síntesis de RNA (RNA polimerasa, cofactores, etc.) o bien a una baja en la eficiencia del templado del DNA (4,11).

DNA.

Se ha observado que la pérdida de viabilidad durante el envejecimiento de las semillas conlleva a una determinada cantidad de aberraciones cromosomales que se manifiestan en la primera división mitótica y que suelen desaparecer a medida que la plántula crece, aunque ciertas anomalías llegan a perdurar hasta la edad adulta (1). La frecuencia de aberraciones cromosomales se incrementa con el periodo de almacenamiento, exceptuando para tratamientos de envejecimiento acelerado muy drásticos (trigo 45°C; 18% contenido de humedad), donde al parecer las lesiones citoplasmáticas que conducen a una pérdida de viabilidad se suceden más rápidamente que el daño al DNA (11).

El daño al genoma de las células del embrión conducen a fallas en los procesos de transcripción y de traducción, eventos esenciales en la síntesis de proteínas necesarias para la germinación. Sin embargo, se cree que durante la imbibición, el embrión es capaz de reparar el daño a sus macromoléculas y estructuras macromoleculares, siempre y cuando los segmentos de DNA que codifican para las enzimas reparadoras no hayan sido dañados y que el daño acumulado no sobrepase su capacidad de reparación (4,11).

1.3.3 Integridad Membranal.

La deshidratación de la semilla conduce a una pérdida de la integridad membranal, la cual es restaurada a medida que la imbibición procede, completándose en una germinación exitosa (4,7). Sin embargo, en la semilla deteriorada se observa una mayor permeabilidad de las membranas a sales y compuestos polares, aumentando la conductividad del medio de imbibición (1,4,11,23). También aumenta la permeabilidad

a la glucosa, aunque aún no se determina con precisión si el aumento de ésta en el medio de imbibición se debe a una menor velocidad de utilización por el embrión (11) ó a diferencias cualitativas en la permeabilidad membranal (4).

El envejecimiento acelerado disminuye la cantidad de los fosfolípidos en la membrana celular, al mismo tiempo que la viabilidad, lo cual no ocurre en el envejecimiento natural (11). Se ha sugerido que la peroxidación de lípidos principalmente los fosfolípidos, constituyentes importantes de la membrana celular, contribuya grandemente al deterioro membranal aunque este evento por sí solo, debido al corto período de vida media de los radicales libres, no puede ser el causante de todo el daño, aunque sí puede ser un componente esencial en la pérdida de la viabilidad (4,11).

1.4 MOVILIZACION DE LAS RESERVAS EN CEREALES

En la sección anterior se ha hecho referencia a los eventos bioquímicos y fisiológicos que suceden en el embrión, y que participan en la germinación, haciendo hincapié en que la falla o retardo de éstos, conducirán a la pérdida de la viabilidad de la semilla.

Una vez que la semilla ha germinado, es decir, ha protruido la radícula (7, 40), se inicia la fase de crecimiento heterotrófico de la plántula. En esta fase de desarrollo, la plántula se encuentra incapacitada bioquímica, fisiológica y estructuralmente para sintetizar los factores tróficos y energéticos que soportarán su desarrollo, por lo tanto, su crecimiento dependerá de la eficiente movilización del material de reserva almacenado en la semilla, así como de su adecuada asimilación por la plántula.

A continuación se consideran los eventos bioquímicos que ocurren

después de la germinación y que son indispensables para mantener el crecimiento de las semillas germinadas.

1.4.1 Estructura y Composición Química de la Semilla de Cereal.

Las semillas de cereales, haciendo hincapié en la de trigo, constan de dos regiones bien definidas: la región axial y la región no axial. La región axial está constituida por los ejes embrionarios que darán origen a una nueva plántula y el escutelo, tejido que adecúa los productos de la hidrólisis de las reservas para su asimilación por el eje embrionario (6).

La región no axial está constituida por el tejido de reserva ó endospermo almidonoso, constituido principalmente por células muertas, y la capa de aleurona, constituida por células vivas y sitio de origen de gran parte de las enzimas que participan en la hidrólisis de los materiales de reserva.

El material de reserva que contiene la semilla de trigo se puede clasificar de acuerdo a su disponibilidad (48): las de consumo inmediato, presentes en la región axial como son glucosa, rafinosa y aminoácidos principalmente y que se consumen durante la imbibición (8); y las de consumo tardío, que se encuentran en las regiones no axiales y para cuya utilización se requiere de hidrólisis previa (9). Este tipo de reserva está constituida principalmente por carbohidratos (almidón) 60-75%, proteínas (glutenina) 10-15% y pequeñas cantidades de lípidos, minerales y vitaminas. Las reservas de utilización tardía son utilizadas para mantener el crecimiento heterotrófico de la plántula (9).

1.4.2 Mecanismo de Control de la Movilización de Reservas.

Durante el crecimiento heterotrófico, la plántula depende

únicamente de la reserva alimenticia almacenada, cuya asimilación depende a su vez de los mecanismos que producen la transformación regulada de estas reservas a una forma que pueda ser transportada y asimilada por las regiones en crecimiento de la plántula (48). Se ha establecido para cereales, que el control en la movilización de las reservas la efectúa el embrión, el cual libera ácido giberélico (AG) que induce a la capa de aleurona a llevar a cabo una serie de cambios metabólicos que resultan en la biosíntesis y/o liberación de las hidrolasas necesarias para degradar las reservas del endospermo almidonoso (9,10).

1.4.2.1 Movilización de Carbohidratos.

El almidón, que constituye el 60-75% de las reservas del endospermo almidonoso, está formado por amilosa y amilopectina. Estos dos compuestos son degradados hasta glucosa por la acción conjunta de cuatro enzimas hidrolíticas (8): alfa amilasa, beta amilasa, alfa glucosidasa y enzimas desramificadoras. La glucosa es transformada posteriormente a sacarosa en el escutelo y transportada al eje embrionario para ser utilizada por la raíz y tallo en crecimiento.

El AG induce la actividad de las siguientes enzimas líticas (9):

- (a) alfa amilasa [EC 3.2.1.1]: síntesis de "novo" en la capa de aleurona y liberación en forma vesicular.
- (b) beta glucanasa [EC 3.2.1.39] síntesis de "novo" en la capa de aleurona. Se secreta simultáneamente con la alfa-amilasa y es necesaria para disolver la pared celular del endospermo para que actúe la alfa-amilasa.
- (c) arabinoxilanasas [EC 3.2.1.8] (pentosanasas): es sintetizada de "novo" en la capa de aleurona, está encargada de modificar la

pared celular del endospermo.

- (d) alfa-glucosidasa: [EC 3.2.1.20]: se sintetiza de "novo" en la capa de aleurona. Es la responsable de degradar la alfa y beta-maltosa hasta glucosa.

Por otra parte, el AG estimula la actividad de la beta-amilasa [EC 3.2.1.2], la cual se encuentra presente en un 80% en grano no germinado de trigo. Esta es liberada por la acción de las proteinasas inducidas por el AG de los cuerpos de glutenina, a los que se encuentra unido por puentes disulfuro. No actúa sobre la reserva almidonosa hasta que lo haya hecho la alfa-amilasa (9).

1.4.2.2 Movilización de Proteínas.

En cereales, las proteínas de reserva se guardan en dos sitios: los granos de aleurona en la capa de aleurona y los cuerpos proteicos del endospermo almidonoso. Las proteínas de cereal son ricas en los aminoácidos prolina, leucina, glutamina y asparagina y deficientes en triptofano y lisina (6,37). Los aminoácidos producto de la hidrólisis de las proteínas de reserva, pueden ser utilizados en la síntesis de proteínas por la plántula en crecimiento o bien para proveer de energía mediante la oxidación del esqueleto hidrocarbonado, después de la desaminación (9).

En cereales existen tres sistemas proteolíticos en operación (9,25):

- (a) Un sistema proteolítico que opera en la capa de aleurona y que provee de aminoácidos para la síntesis de enzimas hidrolíticas bajo el control del AG (alfa-amilasa, proteinasa, etc.).

- (b) Un sistema para la movilización de las reservas en el endospermo para el uso de la plántula en desarrollo. Está formado por dos proteinasas en cebada, una es secretada y sintetizada por la aleurona (controlada por AG) y otra pre-formada en el endospermo y reactivada. En maíz se conocen dos hidrolasas, una endopeptidasa y una carboxipeptidasa sintetizadas de "novo" (sin efecto de AG exógeno) que se requieren simultáneamente para la hidrólisis completa de la proteína de reserva a pequeños péptidos (37).
- (c) Un sistema en el escutelo, que hidroliza a los pequeños péptidos -que son la forma de transporte de los aminoácidos hacia el embrión para evitar la oxidación en el trayecto (37)- hasta los aminoácidos requeridos por las regiones en crecimiento.

Existe evidencia que sugiere que los mecanismos de toma de carbohidratos (sacarosa) y de aminoácidos (glutamina) por el embrión, son completamente independientes (9), sin embargo, se ha encontrado que la actividad de ciertas enzimas indicadoras de reacciones anabólicas (NR) (37), son aumentadas por la adición de glucosa, la evidencia anterior sugiere que el metabolismo de la plántula está regulado por las cantidades relativas de estos dos nutrientes.

1.4.2.3 Movilización de Reservas Menores.

La fitina (sal mixta de K, Mg y Ca del ácido hexafosfórico de mioinositol), es la principal reserva de fosfato y elementos micronutrientes (6), ésta es hidrolizada por la fitasa para dar fosfato, mioinositol y sales (K, Mg y Ca), que al parecer se transportan al eje embrionario por difusión (10). En cereales, las partes no

axiales son fuentes ricas en fitina. La fitasa puede aparecer asociada a los granos de aleurona de la capa de aleurona (cereales) ó a los cuerpos protéicos (dicotiledóneas) (10).

El tejido de reserva es capaz de proveer de suficientes nucleótidos para el eje en crecimiento, aunque éste tiene la capacidad de sintetizarlos a partir de los aminoácidos resultado de la hidrólisis de las proteínas de reserva (10).

1.5 RESERVAS ALIMENTICIAS Y SU RELACION CON LA EXPRESION DEL VIGOR.

La condición indispensable para la germinación, es la viabilidad del embrión, mientras que el vigor se manifiesta durante el crecimiento heterotrófico de la plántula. Asimismo, la movilización de las reservas alimenticias comienza después de que la germinación ha concluido y es la velocidad de movilización de éstas aunada a la capacidad del embrión para utilizarlas, la que determinará el vigor de la plántula durante el periodo heterotrófico.

Generalmente, la pérdida de la viabilidad no va acompañada de un cambio sustancial en la cantidad de las reservas almacenadas (1). Aunque se han reportado algunos cambios en las cualidades de las proteínas de reserva, así como una hidrólisis limitada de almidón y proteína debido a la activación de enzimas hidrolíticas pre-formadas en la semilla (11). Cuando ocurre una hidrólisis importante en el material de reserva, es debido a la acción de microorganismos que utilizan el hidrolizado (azúcares, aminoácidos y lípidos) para nutrirse (1,36,48).

Actualmente se ha reportado una disminución tanto en la biosíntesis como en la activación de ciertas enzimas hidrolíticas del material de reserva en las semillas deterioradas (1,11), aunque sólo se ha

demostrado que la disminución en la biosíntesis de la alfa-amilasa repercute en el vigor de la plántula (48).

Al parecer una de las consecuencias del deterioro de las semillas es la incapacidad de movilización eficiente de las reservas, más que la pérdida de éstas, traduciéndose en un vigor disminuido y manifestándose como una menor velocidad de crecimiento de la plántula heterotrófica.

1.6 CAPACITACION AUTOTROFICA DE LA PLANTULA Y SU RELACION CON LA EXPRESION DEL VIGOR.

Una vez que la plántula ha agotado las reservas almacenadas en la semilla, requiere para su crecimiento y desarrollo de los factores tróficos y energéticos sintetizados por ella misma a partir de la función fotosintética y de asimilación del nitrógeno inorgánico (N₁) (50), por lo tanto, durante la etapa heterotrófica la plántula debe desarrollar la capacidad para realizar estas funciones, es decir, debe de capacitarse para la autotrofia.

La capacidad de la plántula para competir por los nutrientes con las demás plantas y por lo tanto de sobrevivir y completar su ciclo de vida, dependerá del pronto establecimiento de la capacidad autotrófica.

En la literatura se encuentra que una consecuencia del deterioro de las semillas es el lento crecimiento y desarrollo de la plántula autotrófica (23). La evidencia anterior conduce a esperar que el proceso de adquisición de la autotrofia se vea modificado por la disminución del vigor de la plántula, ya que la expresión de éste último dependerá de la adecuada movilización y utilización de la reserva almacenada en la semilla.

1.6.1 Bioquímica de la Adquisición de la Autotrofia.

Durante el crecimiento heterotrófico de la plántula, el endospermo actúa como una fuente de factores tróficos y energéticos que soportarán el crecimiento de la plántula. En esta etapa, la plántula se capacita morfológica, estructural y bioquímicamente para adquirir su independencia y convertirse en un organismo autótrofo.

Entenderemos la autotrofia como la capacidad de la plántula para acoplar el metabolismo de la asimilación de carbono a través de la fotosíntesis (fototrofia) al de la reducción del nitrógeno inorgánico (Ni) (azeotrofia), (49).

La fotosíntesis provee tanto de factores tróficos (azúcares) como de energía (NADH, NADPH y ATP), mientras que la reducción del Ni provee de factores tróficos (aminoácidos) pero requiere de poder reductor.

Las hojas verdes de la plántula, van convirtiéndose paulatinamente en fuente de factores tróficos y energéticos que serán translocados hacia las partes de la plántula que los requieran, adquiriendo paulatinamente su independencia del material de reserva.

Una vez que el material de reserva se ha agotado, el abastecimiento de factores tróficos y energéticos por la fotosíntesis es una condición constante del crecimiento (35).

El crecimiento vegetal está regulado por la interrelación entre las diferentes hormonas vegetales. Se ha observado durante la ontogenia de la hoja de papa, que durante la fase inicial del crecimiento hay un incremento notable en la actividad de citocininas, acompañada de una división celular intensiva y de un gran aumento en la síntesis de clorofila y protefina (35). Asimismo, se ha observado que los pro-

ductos de bajo peso molecular del ciclo de Calvin, junto con el almidón, juegan un papel importante en la regulación de la fotosíntesis, y que una planta fotosintética deficiente en nitrógeno, acumula almidón en los cloroplastos, regulando con ello la fotosíntesis.

La plántula adquiere el carbono heterotrófico a partir de la hidrólisis del material de reserva, mientras que el carbono autotrófico es adquirido a partir de la fijación fotosintética del CO_2 .

El nitrógeno heterotrófico es adquirido mediante la hidrólisis de las proteínas de reserva en forma de aminoácidos y pequeños péptidos (37). El nitrógeno autotrófico es obtenido por la plántula principalmente, a partir de la reducción secuencial en dos pasos del nitrato a amonio. El primer paso es la reducción de nitrato a nitrito, catalizado por la Nitrato Reductasa (NR) dependiente de NAD(P)H . El segundo paso, es la reducción del nitrito a amonio y es catalizada en el cloroplasto por la Nitrito Reductasa (NiR) dependiente de ferredoxina y ATP. El amonio se fija en el cloroplasto vía la Glutamino Sintetasa (GS) que cataliza la amidinación dependiente de ATP del glutamato a glutamina. El N-amido de la glutamina se transfiere al 2-oxoglutarato para formar glutamato, en una reacción dependiente de ferredoxina y catalizada por la Glutamato Sintasa (GOGAT). El grupo amino del glutamato puede ser transferido para formar aspartato y alanina a partir de oxaloacetato, por las enzimas Aspartato Amino-Transferasa (GOT) y Alanina Amino-Transferasa (GPT), formándose además los demás aminoácidos a partir de glutamato, aspartato y alanina con el correspondiente 2-oxoácido y su transaminasa (12,18,30).

Trabajos en hojas de cebada sobre las variaciones diarias de las enzimas involucradas en la asimilación del nitrógeno hasta aminoácidos, reportan que la actividad de la NiR, GS y GOGAT es diez veces

mayor para las dos primeras y tres para la última que la actividad de la NR, tanto en el día como en la noche. Las transaminasas estudiadas, casi no mostraron variación diaria (30), por lo tanto se cree que la reducción del nitrato a nitrito es el paso limitante en la cadena de reacciones de asimilación del nitrógeno y parece ser el sitio regulador clave (12,30).

1.6.2 Interrelación de la Fototrofia y Azeotrofia Durante la Capacidad Autotrófica.

En plántulas de maíz, se ha observado que el $^{14}\text{CO}_2$ autotrófico, es rápidamente movilizado hacia los requerimientos energéticos de la plántula, mientras que el carbón heterotrófico se utiliza preferencialmente para la producción de materia seca en las hojas (14).

Por otra parte, se ha observado, que el ciclo de los ácidos tricarbónicos (C₃TIC) en operación es esencial para proveer de poder reductor (NAD(P)H), necesario en la reducción del nitrato y para proveer de los esqueletos hidrocarbonados necesarios para la asimilación del nitrito en hojas iluminadas (41).

El nitrógeno heterotrófico es brindado por la hidrólisis de las proteínas de reserva en forma de aminoácidos y pequeños péptidos hacia el eje en crecimiento (9,37). Se ha observado que la NR se puede inducir por sustrato desde las 36 h de iniciada la imbibición, en embriones de cebada (19), aunque la capacidad para reducir nitrato está regulada por el aporte de nitrógeno reducido del endospermo, ya que se ha encontrado en diferentes sistemas de los aminoácidos son las formas nitrogenadas que primero se absorben en los tejidos vegetales (37,51). La actividad de la NR se ve regulada también por el aporte de azúcares provenientes de la hidrólisis del almidón de reserva, que

como fuente de ATP y NAD(P)H aumentan la inducción tanto de la actividad de la NR como de la síntesis de proteínas (37).

Utilizando la actividad de la PEPCasa como enzima marcadora de la autotrofia (en este caso fototrofia) en maíz, se ha encontrado que ésta se alcanza a los siete días de iniciada la imbibición (14). Determinando los niveles de las diferentes formas nitrogenadas en savia de plántulas de maíz decapitadas, se observa que el aporte de nitrógeno reducido por el endospermo se termina alrededor del catorceavo día (37).

La evidencia anterior sugiere que primero se alcanza la fototrofia, dada la necesidad de energía y esqueletos hidrocarbonados para la reducción del nitrógeno y una vez establecida ésta, se hace imprescindible la reducción eficiente del nitrógeno inorgánico para proveer de las proteínas necesarias para soportar el crecimiento. A su vez, el proceso de reducción del nitrato, requiere de energía por ello es necesario que quede bien establecida la fototrofia. Al parecer, estos dos procesos son interdependientes durante la etapa de crecimiento heterotrófico y cualquier falta de coordinación entre ambos podría ocasionar una deficiencia en el proceso de adquisición de la autotrofia.

1.7 HIPOTESIS.

De acuerdo a la información anteriormente expuesta, se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

"Si las plántulas provenientes de semillas deterioradas presentan una menor capacidad de crecimiento que las control, entonces en las primeras tanto el proceso de movilización de reservas, como la capacitación autotrófica se encuentran disminuidas."

La capacitación autotrófica comprende dos eventos interdependientes: por un lado, la fototrofia (asimilación del CO_2 atmosférico) y por el otro, la azetrofia (integración del proceso de reducción del Ni al metabolismo general). Si alguno de estos dos eventos no se dan en el tiempo y en el espacio adecuados, ésto se reflejará en una menor capacidad de crecimiento de la plántula.

En este trabajo se estudió solamente la posibilidad de que el proceso de reducción del nitrato sea el responsable de la menor capacidad de establecimiento autotrófico de las plántulas de bajo vigor.

1.8 OBJETIVOS

Para ratificar esta hipótesis, se proponen los siguientes objetivos:

- 1) Obtener una población de semillas deterioradas lo más homogénea posible, la cual manifieste una velocidad de germinación y viabilidad similares al control, pero con una menor capacidad de crecimiento.
- 2) Estudiar la capacidad de movilización de las reservas en plántulas provenientes de semilla control y deteriorada.
- 3) Estudiar la ontogenia de la nitrato reductasa en plántulas control y de bajo vigor.
- 4) Determinar la capacidad de establecimiento autotrófico de las plántulas de ambos lotes a través de cuantificar la eficiencia que presentan para continuar su desarrollo utilizando NO_3^- y CO_2 como fuente de nitrógeno y carbono.

2) MATERIALES Y METODOS.

2.1 REACTIVOS UTILIZADOS.

Los reactivos utilizados en el desarrollo de este trabajo fueron grado analítico y empleados sin purificación posterior. A continuación se enlista la marca y el reactivo empleado.

J.T. BAKER: nitrato de potasio, etanol (96%), malta, sulfato de magnesio, hidróxido de potasio, molibdato de sodio, acetato de cinc, ácido clorhídrico, cloroformo, ácido sulfúrico.

MERCK: agar, cloruro férrico hexahidratado, fosfato diácido de potasio, sal disódica del EDTA, L-cisteína, sulfato de cinc heptahidratado, cloruro de calcio dihidratado, desoxicolato de sodio, reactivo de Folin-Ciocalteu, sulfato de cobre pentahidratado, brucina, nitrito de sodio.

SIGMA: B-nicotinamida adenin-dinucleótido reducido (NADH), metasulfito de fenazina, N-(1-naftil)etilendiamina (NNEDA), sulfanilamida, seroalbúmina bovina.

TECNICA QUIMICA: nitrato de calcio tetrahidratado, hidróxido de sodio.

QUIMICA J.V.C.: cloruro de sodio, tartrato de sodio y potasio.

DISTRIBUIDORA TATCHER: lauril sulfato de sodio.

PHARMACIA: resina Sephadex G-25, azul dextrán 2000.

PRODUCTOS QUIMICOS MONTERREY: ácido tricloroacético.

Para desinfectar las semillas, se utilizó una disolución blanqueadora de la marca CLORALEX con un 6% de cloro activo.

Las disoluciones saturadas que se utilizaron para establecer la humedad relativa de las cámaras de deterioro fueron preparadas utilizando cloruro de sodio y potasio grado técnico y comprados a granel.

2.2 EQUIPO

A continuación se enlista el modelo y marca del equipo utilizado en la realización de este trabajo:

Centrífuga refrigerada de baja velocidad MSE R-6, centrífuga de velocidad media Beckman J2-21 rotor JA20, balanza analítica Mettler, balanza granataria Sartorius, espectrofotómetro Pye-Unicam SP6-550 y Carl Zeiss PMQ II, potenciómetro Sargent-Welch Sci. Co. y Beckman 3550, baño de agua de temperatura controlada Equipar, hornos con circulación de aire forzado Felisa, Blue-M y Fress, incubadoras Lab-Line.

2.3 MATERIAL BIOLÓGICO.

En la realización de este trabajo, se utilizó semilla de trigo (*Triticum aestivum*) variedad Salamanca, cosecha 1984, tratada con fungicida. La semilla se guardó en un recipiente de plástico herméticamente cerrado y a 4°C hasta su utilización. La semilla fue seleccionada lo más homogéneamente posible, desechando para las pruebas aquellas semillas con cualquiera de las siguientes características: endospermo ó embrión rotos ó incompletos, embrión negro ó manchado de fungicida, semilla de color oscuro o muy pequeña.

2.4 METODOLOGÍA DEL DETERIORO DE SEMILLAS.

Para obtener la semilla deteriorada, se utilizó el método de envejecimiento acelerado, que consiste en someter al lote de semillas a temperaturas y humedades relativas altas. Consideramos que la semilla deteriorada por este método es un buen modelo, representativo del deterioro por envejecimiento natural (22).

Los diferentes grados de humedad relativa fueron proporcionados por las disoluciones saturadas de las siguientes sales, de acuerdo con

Winston y Bates (52): 75% humedad relativa (HR) con cloruro de sodio y 85% HR con cloruro de potasio. El 100% de HR se logra con agua destilada pura.

Las temperaturas constantes de 5°, 20°, 30° C fueron mantenidas dentro de incubadoras Lab-Line y las de 40°, 42° y 45° en estufas de mira reforzado Felisa y Blue-M, con una precisión de ± 1 y $\pm 2^\circ$ C respectivamente.

Las cámaras de deterioro fueron cajas de plástico transparente de 36.0 x 26.5 x 13.5 cm con tapa hermética. En el fondo de la caja se colocaba 1 l de la disolución saturada correspondiente y luego un soporte profusamente horadado para posteriormente colocar encima los contenedores y cerrar herméticamente. Una vez cerrada, la cámara era colocada inmediatamente en la incubadora ó estufa, a la temperatura deseada.

Después del tratamiento, la semilla era secada a temperatura ambiente por 24 h y luego guardada a 4°C.

2.4.1 Deterioro Acelerado

Con la finalidad de explorar las condiciones de temperatura y HR adecuadas para obtener el material biológico con el grado de deterioro requerido, se realizaron tres experimentos diferentes, explorando diversas combinaciones de temperatura, humedad relativa y tiempo (diag. 2.1).

Cada unidad experimental, está representada por una condición de temperatura y humedad relativa. Se pesaron 240 g de semilla experimental y se repartieron en 12 contenedores de plástico profusamente horadados de 5.0 cm de diámetro x 6.0 cm de altura conteniendo 20 g de semilla cada uno. Cada muestreo se realizó con

cuatro repeticiones.

2.4.2 Metodología para la Optimización de las Condiciones de Deterioro.

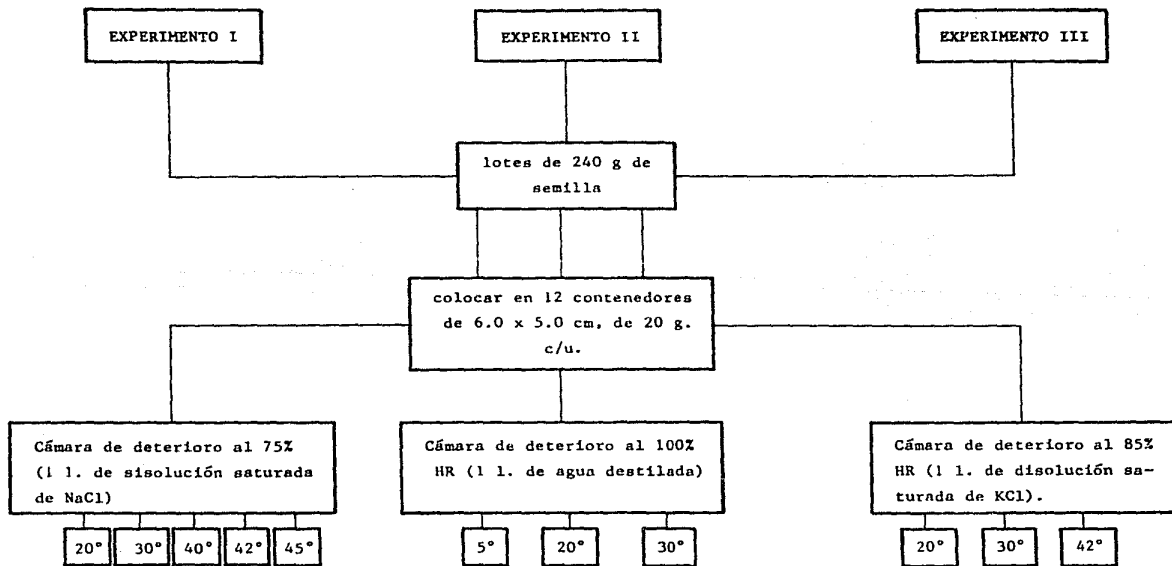
Una vez realizados los experimentos señalados en el diagrama 2.1, se valoró la influencia del contenido de humedad inicial de la semilla en el deterioro. Para ello se deterioraron dos lotes de semilla por los siguientes métodos:

METODO A. Contenido inicial de humedad de la semilla 11%. Dos lotes de 100 g de semilla se colocaron en cestas de plástico de 15.5 x 26.0 cm formando una capa única en el fondo. Se introdujeron en una cámara de deterioro a una humedad relativa del 85% y temperatura de 42°C, haciendo muestras a los 3,6,8,9,10 y 12 días.

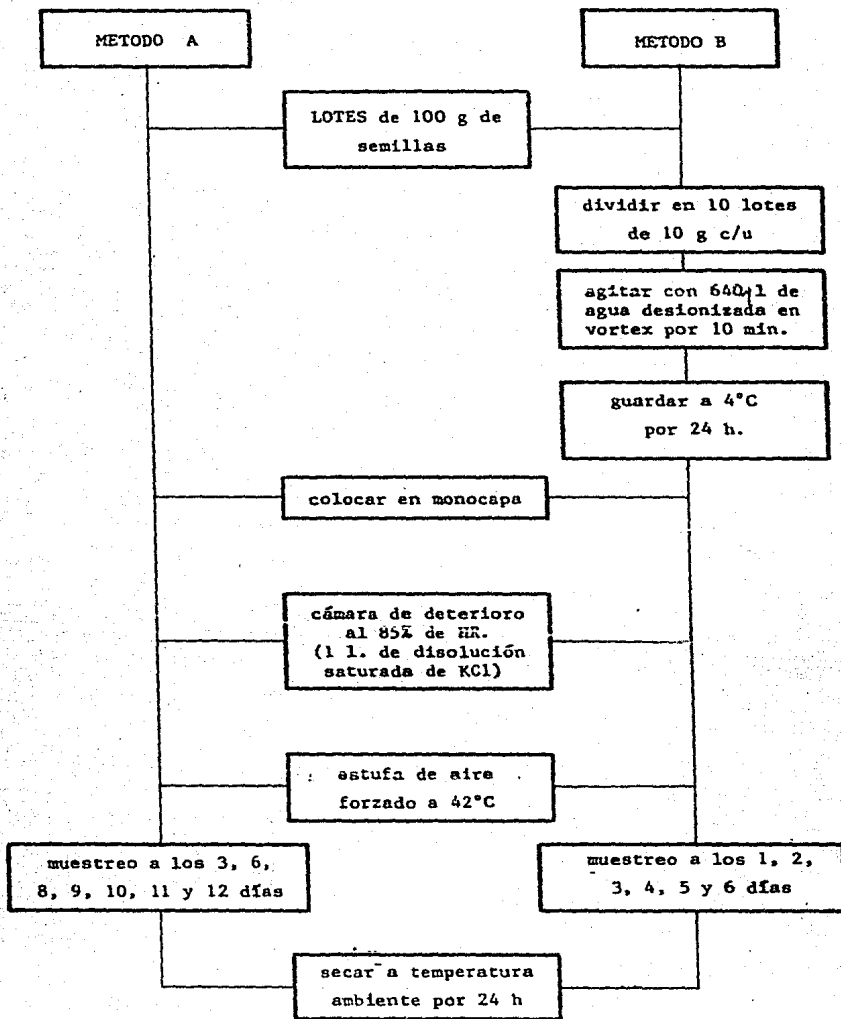
METODO B. Contenido inicial de humedad de la semilla 17%. Se pesaron 10 lotes de semillas de 10 g c/u y se colocaron en tubos de plástico para centrifuga de 30 ml con rosca y se agitaron durante 10 min en un vortex con 660 microl de agua desionizada para ajustar el contenido de humedad de la semilla a 17%. Posteriormente fueron sometidas a las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa que el método A (diag. 2.2).

La cantidad de agua requerida para ajustar el contenido de humedad de la semilla a 17% se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula (36):

$$\text{masa de agua} - \left[\frac{100 - \% \text{ humedad de la muestra}}{100 - \% \text{ humedad deseada}} - 1 \right] \text{ masa de la muestra}$$



Diag. 2.1 DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE DETERIORO ACELERADO.



Diag. 2.2 METODOS A Y B PARA DETERIORO ACELERADO.

2.5 METODOLOGIA PARA LA EVALUACION DEL ESTADO FINAL DE LA SEMILLA SOMETIDA A TRATAMIENTO DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO.

Inmediatamente después que el lote de semillas era sacado a la cámara de deterioro se le determinaba el contenido de humedad para establecer el grado de hidratación de la semilla. Una vez secada a temperatura ambiente por 24 h, se le determinaba: micoflora, para indicar la indeseada invasión por hongos de almacén; velocidad de germinación y germinación acumulada a los 7 días, para establecer el buen estado fisiológico y la viabilidad del lote de semillas y; el peso seco de la plántula, para evaluar el vigor.

2.5.1 Contenido de Humedad de la Semilla.

Cajas de aluminio de 5.0 cm de diámetro x 1.5 cm de altura con tapa y numeradas, se limpiaban con algodón humedecido con etanol al 96% y se pesaban en una balanza analítica Mettler. En la caja previamente pesada se colocaba una capa de semilla de trigo por determinar el contenido de humedad y se tapaba de inmediato, procediendo a pesar nuevamente. Las cajas con semilla ya pesadas y destapadas, se colocaban a secar en una estufa de aire forzado Freas a 103°C por tres días (36). Una vez transcurrido este tiempo, eran enfriadas en un desecador y pesadas de nuevo. El contenido de humedad de la muestra era determinado en base al peso fresco, de la siguiente manera (11,36):

$$\% \text{ CH} = \frac{\text{peso fresco de la semilla} - \text{peso seco de la semilla}}{\text{peso fresco de la semilla}} \times 100$$

Cada determinación fue hecha por duplicado.

2.5.2 Micoflora.

Muestras de 25 semillas eran colocadas en 5 hileras de 3, 6, 7, 6

y 3 semillas respectivamente en un medio de cultivo selectivo para hongos de almacén de malta, sal y agar (MSA) al 2, 6 y 2% respectivamente, en cajas de Petri de 10 cm de diámetro (17). Cada determinación se hizo por duplicado de cada lote de semillas. Las semillas, previamente fueron agitadas vigorosamente en una disolución etanólica al 50%, para remover el fungicida y desinfectadas agitándolas vigorosamente en una disolución de hipoclorito de sodio al 2%. Las semillas una vez sembradas se pusieron a incubar en un cuarto de crecimiento a $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 7 días.

2.5.3 Medición de la Viabilidad y Velocidad de Germinación.

La viabilidad del lote de semillas, fue determinado como el porcentaje de germinación a los siete días de iniciada la imbibición. La velocidad de germinación, se determinó como el porcentaje de germinación acumulada cada 24 h, por un período de tres días. Para determinar estos parámetros, se utilizó la siembra en "TACO", descrita por Tiburcio (48). Las semillas fueron germinadas en la oscuridad y a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$.

2.5.4 Determinación del Vigor de las Semillas.

El vigor de las semillas se midió a partir del peso seco de la plántula, éste último fue tomado como parámetro de crecimiento (48).

Para ello se utilizaron las plántulas de la prueba de viabilidad. Una vez hecho el conteo del porcentaje de germinación, se pusieron a secar por separado coleóptilos, raíz y endospermos de las plántulas germinadas, a 60°C por tres días en una estufa de aire forzado Felisa.

2.6 METODO DE SIEMBRA

La semilla fue sembrada en hileras de 10 x 10 de acuerdo con la

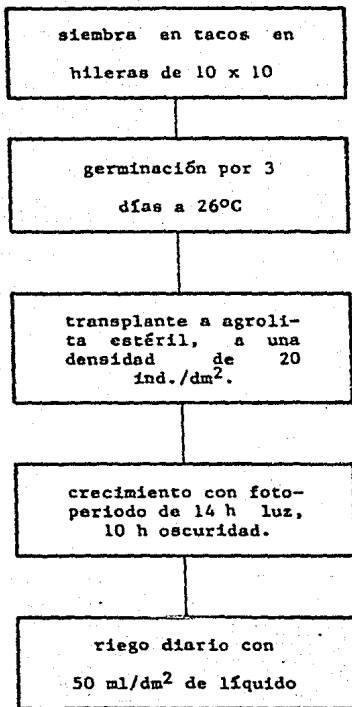
técnica del "TACO" y puestas a germinar a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por tres días. Al tercer día, las semillas germinadas eran transplantadas a un soporte inerte de agrolita, ésta era utilizada nueva, lavada con agua destilada y esterilizada a 15 lb de presión durante 1 h.

Una capa húmeda de agrolita de 4 cm de espesor, era colocada en el fondo de una charola de plástico, sobre la agrolita se colocaban las semillas germinadas y se cubrían con una capa de agrolita de 2 cm de espesor. Las charolas se trasladaban a un cuarto de crecimiento adaptado, en el cual era mantenido un fotoperiodo de 14 h luz y 10 h oscuridad, con una intensidad de luz de 5 000 lux, proveniente de bulbos de neón de 40 W y a una temperatura de 28°C .

El germinado de trigo era sembrado con una densidad de población de 20 individuos/ dm^2 y regados diariamente a la misma hora con la misma cantidad de líquido, aproximadamente de 50 ml/ dm^2 (diag. 2.3). Para el riego se utilizaba agua desionizada, o bien una disolución nutritiva de Hoagland (24) diluida a la mitad con ó sin nitratos, a un pH de 5.5 - 5.7. La solución de Hoagland era preparada adicionando las sales en el orden indicado en la referencia y siguiendo la indicación de hacerlo en 1.5 l de agua con agitación constante y ajustando el pH con KOH antes de aforar a 2 l (49).

2.7 COSECHA DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

Las plántulas eran cosechadas después de 4 a 6 h de iniciado el fotoperiodo de luz, ya que en este tiempo la nitrato reductasa presenta un pico de máxima actividad (fig. 2.2). Se cosechaban las plántulas que tuvieran el mismo grado de desarrollo, colectando la parte aérea y desechando raíz y endospermo. Las canopias eran inmediatamente pesadas, lavadas con agua corriente y luego con agua



Diag. 2.3 METODO DE SIEMBRA

desionizada, quitando el exceso con papel secante. Inmediatamente después se procedía a hacer el extracto enzimático. En algunas ocasiones fue necesario guardar el material biológico, ésto se hacía envolviéndolo en papel aluminio, congelando en nitrógeno líquido y guardando a -70°C por un periodo no mayor de 7 días.

De la misma cosecha se tomaba una muestra no menor de 10 plántulas para determinar peso seco, poniendo a secar por separado partes aéreas, endospermo y raíz (diag. 2.4).

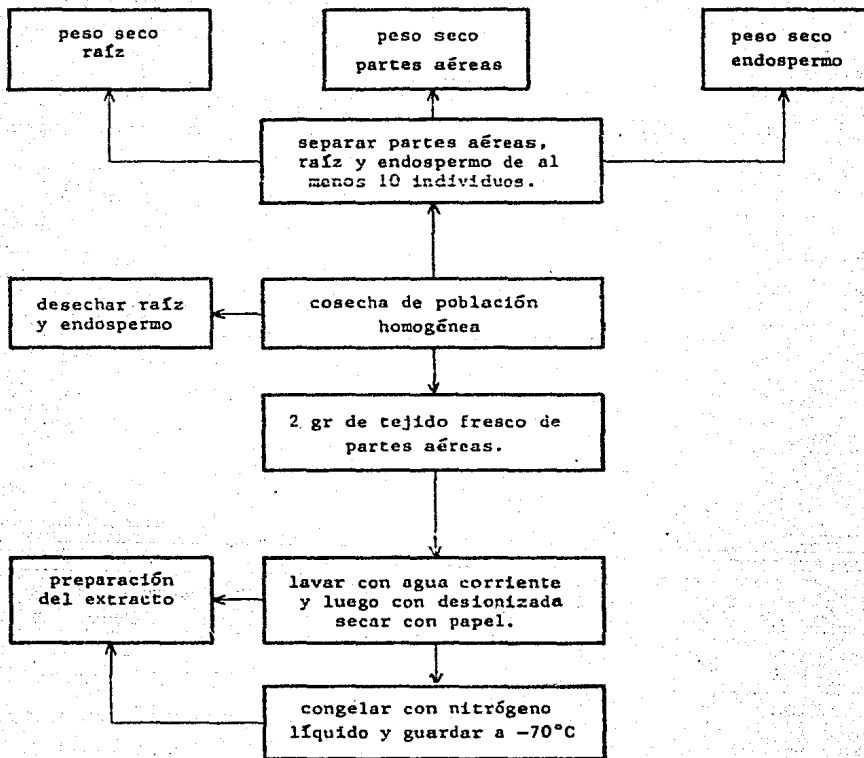
2.8 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA NITRATO REDUCTASA (ANR).

2.8.1 Obtención del Extracto Enzimático para la Determinación de la ANR.

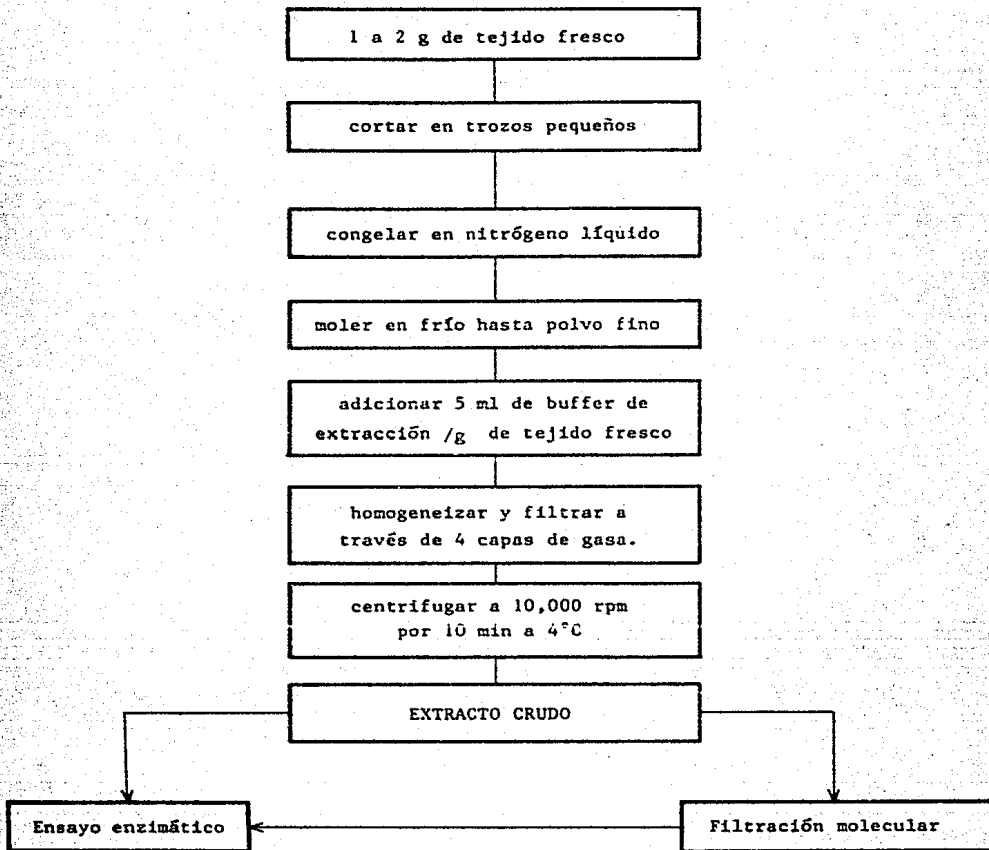
De 1 a 2 g del material biológico (canopias) se cortaba en trozos pequeños y se congelaba con nitrógeno líquido en un mortero. Una vez evaporado el nitrógeno, se hacía la molienda hasta polvo fino y se dejaba a temperatura ambiente. Cuando el polvo empezaba a descongelarse, se ponía el mortero en un baño de hielo y se le adicionaban 5 ml de buffer de extracción (25 mM KH_2PO_4 , 5 mM EDTA y 5 mM l-cisteína, pH 7.8) (47). La suspensión formada, era rápidamente homogeneizada y filtrada a través de cuatro capas de gasa. El filtrado se recibía en tubos de centrifuga corex de 15 ml previamente enfriados en baño de hielo, y centrifugado a 10 000 rpm en la centrifuga Beckman J2-21 rotor JA-20 por 10 min a 4°C . El sobrenadante fue denominado como extracto crudo, y era utilizado inmediatamente para determinar la ANR o bien desalado por filtración molecular (diag. 2.5).

2.8.2 Filtración Molecular del Extracto Enzimático Crudo.

En la literatura se ha reportado que en extractos enzimáticos



Diag. 2.4 COSECHA DEL MATERIAL BIOLÓGICO



Diag. 2.5 OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO CRUDO.

crudos de hoja de maíz, la cantidad de nitrato endógeno es capaz en presencia de NADH exógeno de dar una apreciable cantidad de ANR "in vitro" (16). Por ello se ha optado por desalar el extracto enzimático antes de ensayar la ANR. Por otra parte, se conoce también que la NR es una enzima muy lábil que pierde rápidamente actividad víctima de las proteasas (20,27). Por lo anteriormente expuesto se decidió evaluar la conveniencia de desalar el extracto enzimático antes de ensayar la ANR "in vitro" en las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio.

El desalado se llevó a cabo a través de una columna de Sephadex G-25 grado medium de Pharmacia. La resina una vez hidratada durante 12 h y removidos los finos, era empacada en una columna de Biorad de 1.8 mm de diámetro x 30 cm de largo con un volumen de cama de 19 cm³ y un volumen externo de 12.5 cm³, determinado con azul Dextrán 2,000.

Prevía utilización de la columna, ésta era equilibrada con 3 volúmenes del volumen de cama de buffer de extracción y una vez utilizada, era lavada con 3 volúmenes de cama de agua desionizada.

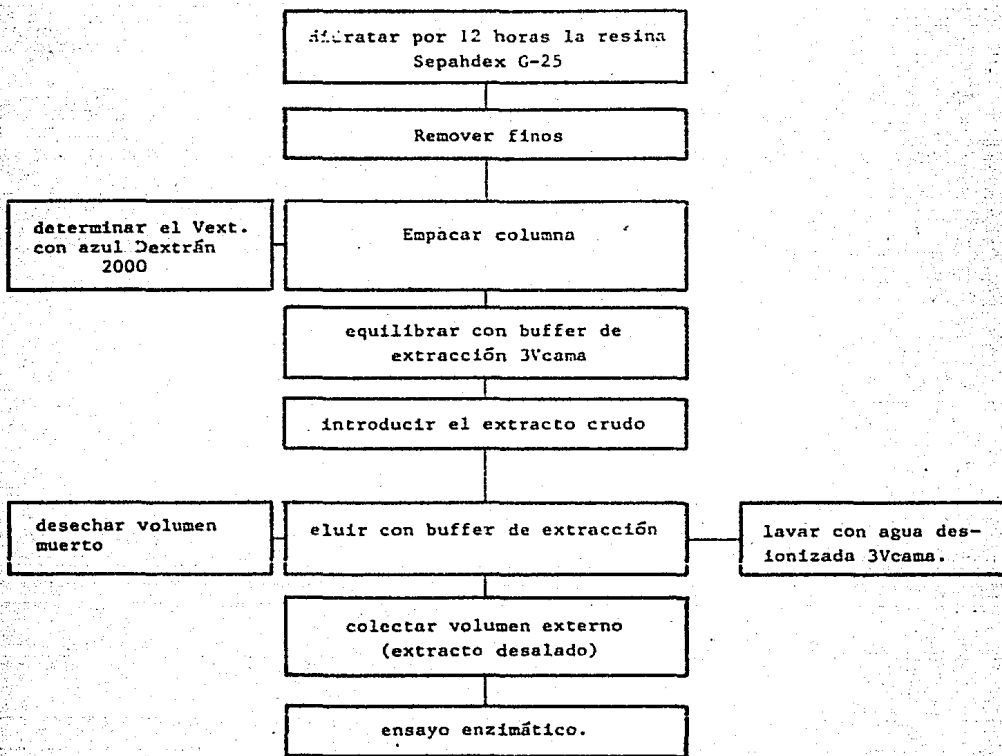
El volumen de extracto enzimático por filtrar nunca fue mayor de 6 ml y toda la operación fue llevada a cabo entre 0 y 4°C (diag. 2.6).

2.8.3 Ensayo de la Actividad de la Nitrato Reductasa.

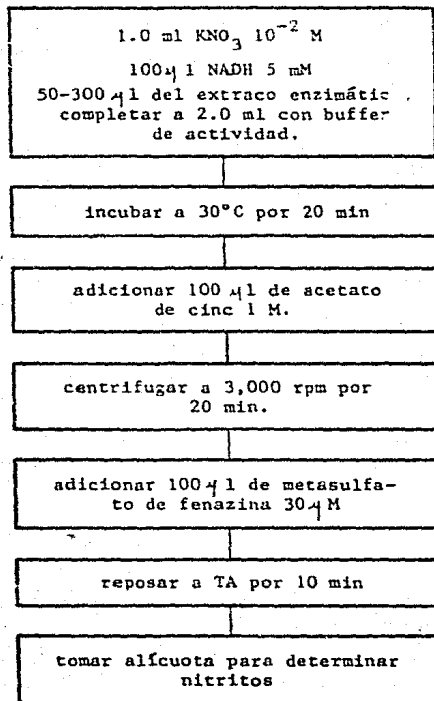
La ANR fue determinada midiendo la aparición de nitritos como producto de la reducción del nitrato, utilizando como donador de electrones al NADH, de acuerdo a la siguiente reacción (12):



El ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera: en tubos de ensayo de 80 x 10 mm se adicionó 1.0 ml de disolución de nitrato de



Diag. 2.6 FILTRACION MOLECULAR DEL EXTRACTO ENZIMATICO CRUDO.



Diag. 2.7 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA NITRATO REDUCTASA.

potasio $10^{-2}M$ (preparado con buffer de actividad), 100 microl de NADH 5 mM (recién preparado) y completando a un volumen de 2.0 ml menos el volumen del extracto enzimático, con buffer de actividad (100 mM de KH_2PO_4 pH 7.5). La reacción era iniciada adicionando a la mezcla anterior de 50 a 300 microl del extracto enzimático. La mezcla de reacción era incubada a $30^{\circ}C$ durante 20 min, tiempo después del cual se adicionaban 100 microl de acetato de cinc 1 M para dar fin a la reacción. Los tubos eran centrifugados a 3 000 rpm en la centrifuga MSE durante 10 min. Al sobrenadante se le adicionaban 100 microl de una disolución de metasulfato de fenazina 30 microM para oxidar el NADH remanente, ya que éste interfiere con el desarrollo del color para detectar nitritos (49) y se dejaba a temperatura ambiente durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se tomaba una alícuota para determinar los nitritos producidos. La concentración de Nitrato Reductasa se expresó en nmol de nitritos producidos durante 20 min (diag. 2.7).

2.9 OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES PARA MEDIR LA ANR.

2.9.1 Efecto del Desalado en la ANR.

Para verificar si la ANR "in vitro" es afectada por el desalado, se procedió a determinarla en extracto crudo y desalado, para ello se crecieron plántulas de trigo control, regándose 24 h antes de la cosecha con disolución nutritiva de Hoagland + NO_3^- , y diariamente con $Hg-NO_3^-$. Una vez cosechado el lote, se extrajo la enzima y se determinó la ANR en el extracto crudo, pasando posteriormente el extracto por una columna de filtración molecular y determinando después la actividad (extracto desalado). Los resultados se muestran en la fig.

2.1. Se puede observar que la ANR "in vitro" en extracto crudo es

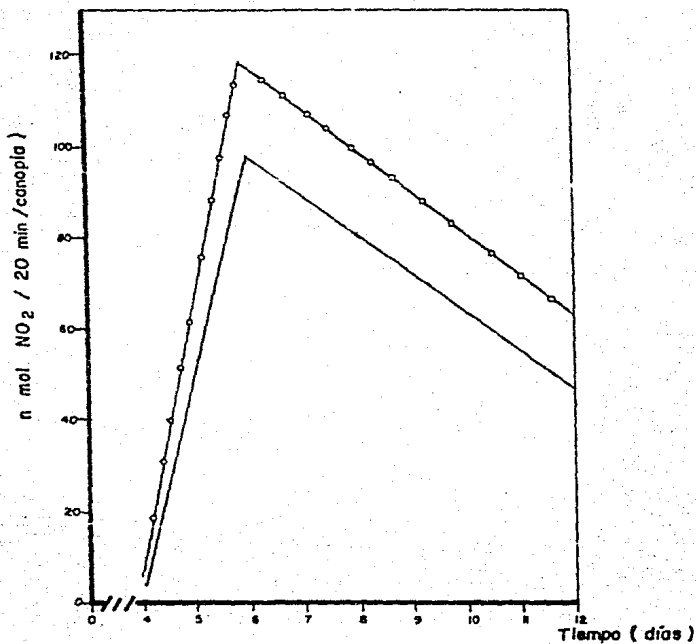


Fig. 2.1 EFECTO DEL DESALADO EN LA INDUCCION DE ANR.

Plántulas de trigo control, regadas 24 h antes con $Hg^{+}NO_3^-$.

(—○—) extracto enzimático crudo; (—) extracto enzimático desalado.

ligeramente mayor que en extracto desalado, sin embargo, la diferencia en actividad no es significativa. Por ello, en los siguientes experimentos se ensayó la ANR en extracto crudo.

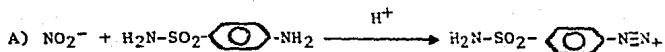
2.9.2 Efecto del Tiempo de Iluminación en la ANR.

Se ha reportado en la literatura, que la NR posee una ritmicidad circadiana afectada por la intensidad luminosa, más que por la calidad de la luz (31). También se sabe que la NR manifiesta variaciones diurnas pronunciadas, incrementándose en 50-100% de actividad durante el fotoperiodo de luz, a diferencia de las demás enzimas de la vía de asimilación del nitrógeno inorgánico, cuya actividad no se ve afectada por la luz (30). Con la finalidad de establecer las variaciones diurnas de la ANR, se cosecharon plántulas de 9 días de edad regadas continuamente con una disolución de Hg-NO_3^- , adicionando los nitratos 24 h antes de la cosecha y determinando al ANR a las 2, 4, 6, 8 y 10 h de iniciado el fotoperiodo. En la fig. 2.2 se puede observar que la ANR máxima se manifiesta entre las 4 y 5 h de iniciado el fotoperiodo, observándose un aumento en la proteína soluble proporcional al tiempo de iluminación. En los experimentos posteriores, se decidió efectuar la cosecha del material biológico entre las 4 y 6 h de iluminación.

2.10 DETERMINACIONES ANALITICAS.

2.10.1 Determinación de Nitritos.

La determinación de los nitritos se efectuó colorimétricamente, siguiendo la reacción de formación de un complejo colorido entre el N-(1-naftil) etilendiamina (NNEDA) (B) con la sal de diazonio formada entre el nitrito y la sulfanilamida en medio ácido (A) (46).



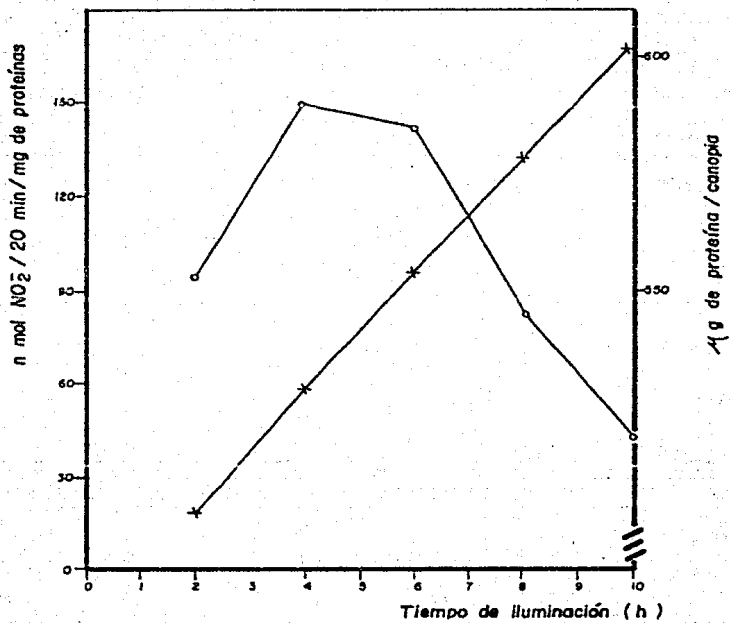
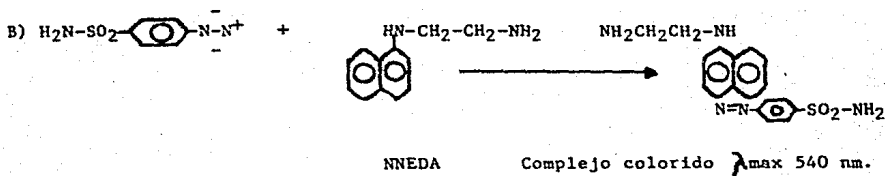


Fig. 2.2 CINÉTICA DE ACTIVIDAD LUMINOSA DE LA NR. Plántulas de trigo control de 9 días de edad, regadas 24 h antes con $Hg+NO_3^-$. (—○—) ANR; (—X—) proteína soluble.



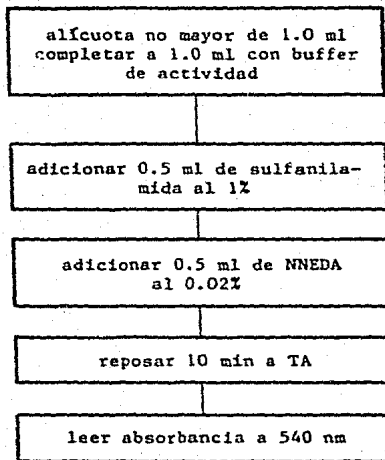
En tubos de 80 x 10 mm se colocó una alícuota de la muestra, conteniendo entre 4 y 40 n mol de NO_2^- , no mayor de 1.0 ml, se añadió 0.5 ml de una disolución ácida de sulfanilamida (1% de sulfanilamida y 10% de ácido tricloro acético en HCl 3N) y 0.5 ml de una disolución de NNEDA al 0.02%.

La mezcla se dejaba reposar a TA durante 10 min, determinando la absorción del complejo colorido a 540 nm. Al blanco de reactivos se le adicionó 1.0 ml de buffer de actividad en lugar de nitritos (diag. 2.8).

Para la curva patrón (fig. 2.3) se utilizó una disolución patrón de nitrito de sodio 100 μ M recién preparada a partir de un stock de nitrito de sodio 100 mM que contenía 6.5 mM de NaOH para evitar la reducción del nitrito por el CO_2 ambiental (49).

2.10.2 Determinación de Proteínas por el Método de Peterson.

Las proteínas fueron determinadas de acuerdo con Peterson (39), modificación al Lowry original. En tubos de 80 x 10 mm se colocaba una alícuota de 25 a 300 μ l conteniendo de 5 a 100 μ g de proteína y se completaba a 1.0 ml con agua desionizada, posteriormente se adicionaban 100 μ l de una disolución de desoxicolato de sodio al 0.15%, agitando y dejando reposar a TA por 10 min. Una vez transcurrido este tiempo, los tubos eran sumergidos en un baño de hielo y se les adicionaban 100 μ l de una solución de ácido tricloroacético al 50%



Diag. 2.8 DETERMINACION DE NITRITOS.

A 540

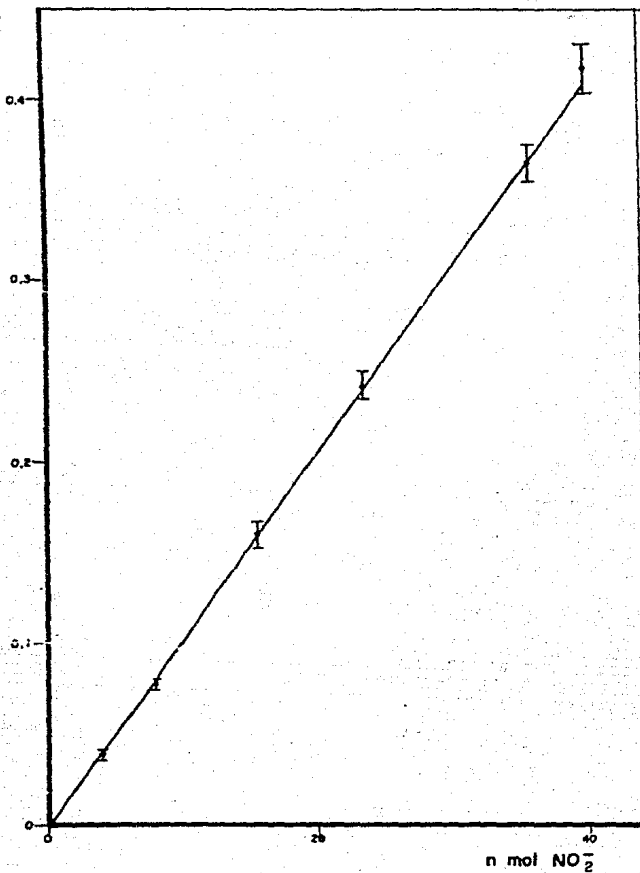


Fig. 2.3 CURVA PATRON DE NITRITOS.

Cada punto es la media de tres determinaciones independientes, realizadas por duplicado. (I) desviación estándar.

(previamente enfriado) y se dejaba reposar durante 15 min en baño de hielo. Acto seguido, los tubos se centrifugaban a 3 000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante era desechado por decantación y el exceso eliminado mediante papel absorbente de las paredes de los tubos.

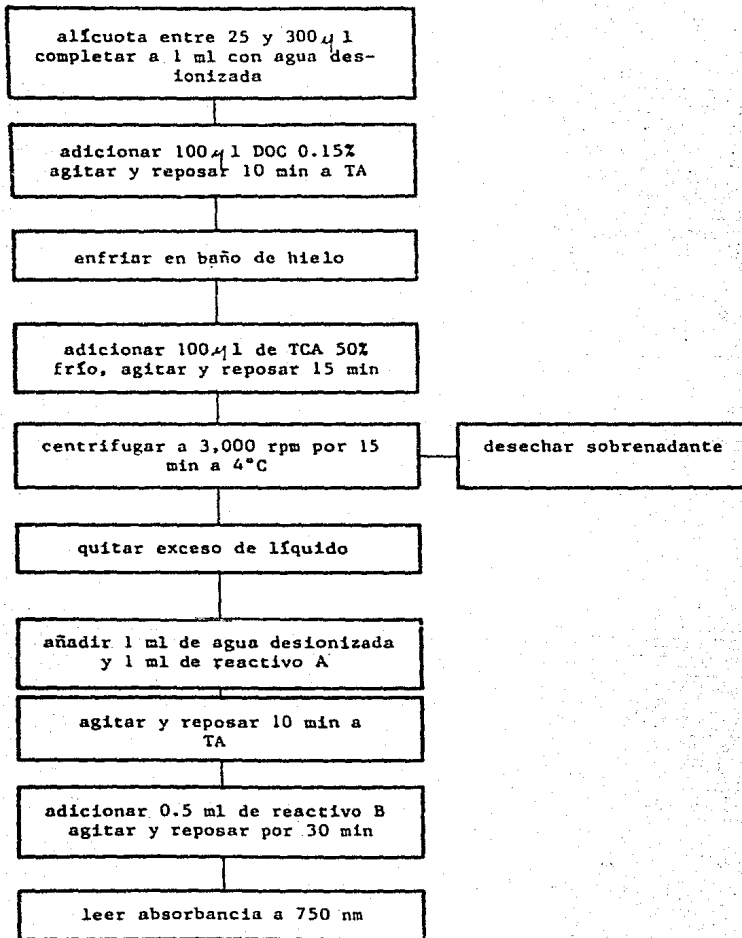
A los tubos ya secos, se les adicionaba 1.0 ml de agua desionizada y 1.0 ml del reactivo A (disolución patrón de tartrato-carbonato de cobre, NaOH 0.8 N, lauril sulfato de sodio al 10% y agua, en relación 1:1:1:1, estable por dos semanas) y se dejaba reposar durante 10 min a TA. Transcurrido este tiempo, se adicionaban 0.5 ml del reactivo B (reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada 1:6 estable a TA en frasco ámbar), se agita y se deja reposar a TA por 30 min (diag. 2.9). Se lee la absorbancia del complejo colorido a 750 nm.

La disolución patrón de tartrato-carbonato de cobre se preparó añadiendo lentamente y con agitación una solución de carbonato de sodio anhidro al 20% a una solución de sulfato de cobre-tartrato de potasio, para dar una concentración final de 0.1% de sulfato de cobre pentahidratado, 0.2% de tartrato de sodio y potasio y 10% de carbonato de sodio anhidro (disolución estable a TA por dos meses).

La curva patrón de proteínas se hizo utilizando seroalbúmina bobina (SAB) en una concentración de 500 μ g/ml, graficando el logaritmo de la absorbancia contra el logaritmo de la cantidad de proteína en microgramos (fig. 2.4).

2.10.3 Determinación de Nitratos.

La cantidad de nitratos presente en las muestras, fue determinada colorimétricamente, midiendo la absorción del complejo colorido resultante de la oxidación de la brucina (alcaloide de alta toxicidad) (46).



Diag. 2.9 DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE PETERSON.

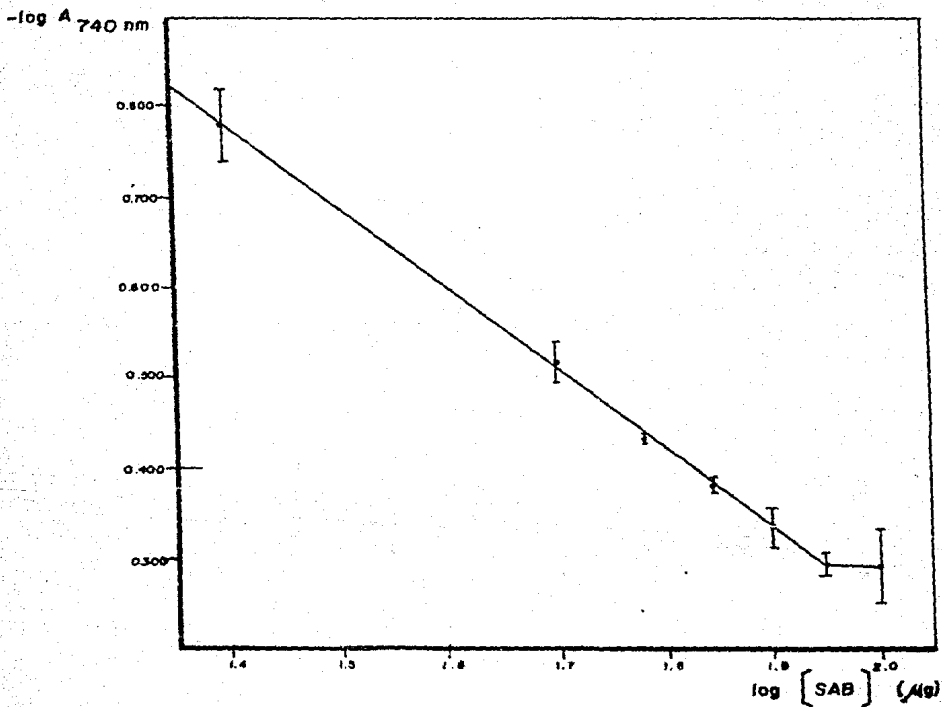
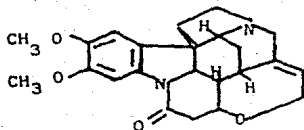


Fig. 2.4 CURVA PATRON DE PROTEINAS.

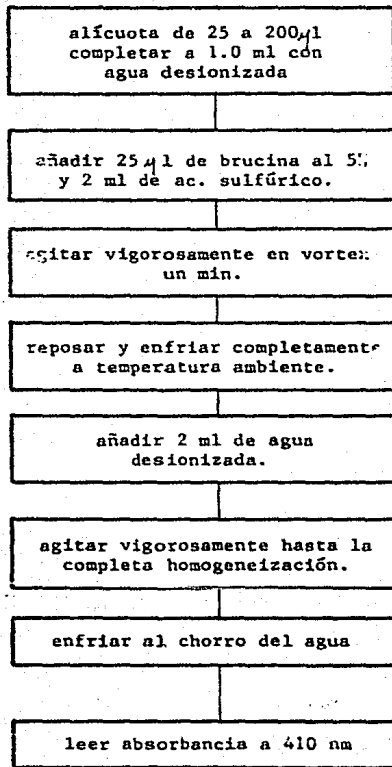
La cantidad de proteina fue evaluada de acuerdo con Peterson (39), utilizando como patrón la seroalbúmina bobina (SAB). Cada punto es la media de por lo menos cinco determinaciones por duplicado. (I) desviación estándar.



Estructura de la brucina 6,10,11-dimetoxiestrichnina.

En tubos de ensaye de 80 x 10 mm se colocaba la muestra de 25 a 200 μ l, conteniendo entre 5 y 40 μ g de nitrato, completando a 1 ml con agua desionizada. Se adicionaban 25 μ l de una disolución recién preparada de brucina al 5% en cloroformo y acto seguido se añadían 2 ml de ácido sulfúrico concentrado, agitando vigorosamente en vortex durante 1 min ó hasta que la mezcla de reacción tomara un color amarillo. Se tenía especial cuidado en proteger cara y manos, ya que el ácido sulfúrico crepitaba al contacto con el agua. La mezcla de reacción se dejaba rep' a temperatura ambiente, debiendo tomar la mezcla de reacción un color amarillo. Ya fría, se añadía lentamente 2 ml de agua desionizada y se agitaba vigorosamente hasta la total homogeneización de la mezcla. Se enfriaban los tubos en baño de hielo ó al chorro del agua y se leía la absorbancia del complejo colorido a 410 nm (diag. 2.10).

La curva patrón (fig. 2.5) fue determinada utilizando una disolución patrón de 200 μ g/ml de nitrato de sodio anhidro (secado a 110°C por 1 h).



Diag. 2.10 DETERMINACION DE NITRATOS.

$A_{410\text{nm}}$

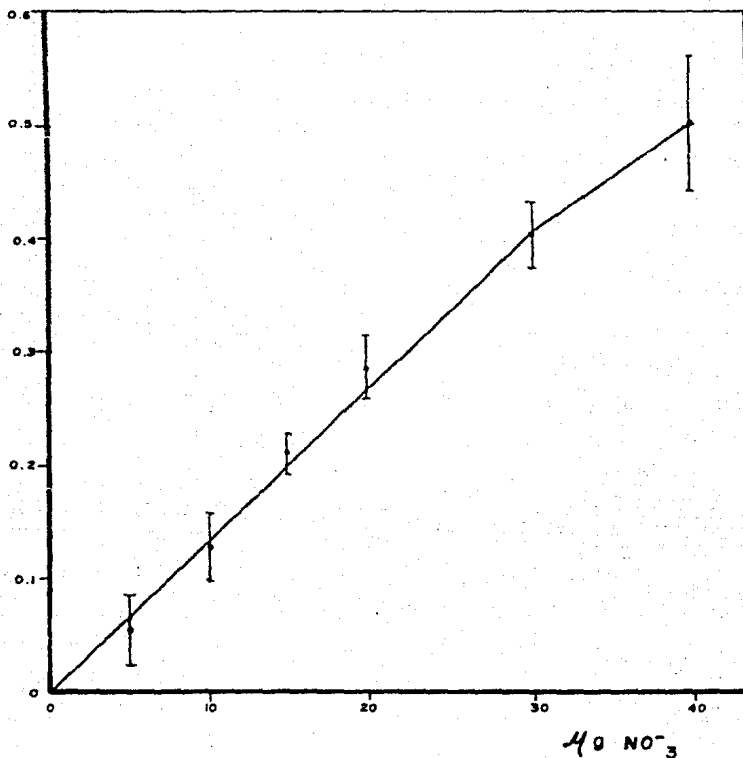


Fig. 2.5 CURVA PATRON DE NITRATOS.

Cada punto es la media de por lo menos tres determinaciones independientes realizadas por duplicado. (I) desviación estándar.

3) RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se dividen en dos partes: la primera parte consiste en los experimentos llevados a cabo para obtener la semilla deteriorada que se requería para este trabajo; y la segunda, de los experimentos bioquímico-fisiológicos.

3.1 RESULTADOS DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO.

La parte de deterioro o envejecimiento acelerado, se presentará como los resultados de tres experimentos independientes, los cuales se utilizaron como base para seleccionar las condiciones de deterioro adecuadas para obtener las semillas con las características requeridas.

3.1.1 Efecto del Contenido de Humedad de la Semilla en la Velocidad de Germinación.

Después de que la semilla es almacenada en condiciones de alta temperatura y humedad relativa (H.R.), gana diferentes cantidades de agua (tab. 3.1). Esto le permite activar ciertos procesos metabólicos (7) que podrían oscurecer la evaluación del tratamiento en la pérdida de vigor. Para tratar de eliminar esta posibilidad se determinó el efecto del tratamiento de deterioro cuando la semilla se secaba o no, previo a las pruebas de germinación (tab. 3.1). Se utilizaron las condiciones de almacenamiento de 40° y 75% H.R.; 45° y 75% H.R. y 30° y 100% H.R.

Tanto para semilla secada a temperatura ambiente (TA) por 24 horas como para semilla húmeda recién sacada del tratamiento, se midió el % de germinación acumulada a diferentes tiempos y el coeficiente de

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO H.R. Y TEMP.	PERIODO	% CONTE NIDO DE HUMEDAD	SEMILLA HUMEDA (1)					SEMILLA SECA (2)						
			% DE GERMINACION ACUMULADA \pm 2% EN LOS DIAS:											
			1	2	3	7	CVG(3)	1	2	3	7	CVG		
Control	0	10.75												
75% HR; 20°C	3	13.4	30	86	98	98	0.58	15	80	97	97	97	0.49	
	6	13.6	23	87	97	98	0.54	22	70	95	95	95	0.49	
	10	13.3	15	78	98	98	0.49	17	68	85	94	94	0.50	
75% HR; 45°C	2	13.1	15	93	95	99	0.53	32	85	95	96	96	0.56	
	4	13.0	5	90	97	97	0.49	22	77	92	95	95	0.52	
	6	12.6	8	62	83	97	0.46	15	76	82	93	93	0.53	
100% HR; 30°C	3	20.6	25	90	95	99	0.56	22	82	93	97	97	0.53	

Tabla 3.1 EFECTO DEL SECADO EN LA VIABILIDAD Y VELOCIDAD DE GERMINACION DE LA SEMILLA DE TRIGO. Cada Resultado es el promedio de 4 determinaciones por duplicado.

- 1) Semilla puesta a embeber inmediatamente después del tratamiento.
- 2) Semilla puesta a embeber después de haber sido secada a TA por 24 h.
- 3) CVG, coeficiente de velocidad de germinación, determinado al tercer día:

$$CVG = \frac{\sum n}{Dn} \quad (40)$$

n = número de semillas germinadas por separado.
D = Día del conteo.

velocidad de germinación (CVG). Los resultados de estos experimentos se compendian en la tabla 3.1, observándose que si bien en las primeras 24 h de imbibición, el 1% de germinación acumulada es igual ó un poco mayor cuando la semilla está seca, en las siguientes 24 h y 48 h, este porcentaje se invierte ó disminuye para la semilla seca, siendo en todos los casos el % de germinación tanto a los tres como a los siete días menor para semilla seca que para semilla húmeda. También se observa en cada tratamiento que a medida que aumenta el tiempo de envejecimiento acelerado, el porcentaje de germinación, tanto a los tres como a los siete días disminuye. Esta disminución es más evidente en el caso de semilla seca que en la húmeda.

Estos resultados parecen indicar que el proceso de deterioro de la semilla almacenada bajo condiciones adversas, implica cierto daño que puede ser reparado mientras que la semilla se encuentre en cierto grado de hidratación constante, ya que si es secada y vuelta a hidratar, este daño se hace irreparable, manifestándose en la disminución del porcentaje de germinación. De acuerdo con estos resultados, se procedió a secar la semilla después de cada tratamiento a TA por 24 h.

3.1.2. Selección de las Condiciones de Almacenamiento para la Obtención de Semilla de Trigo de Bajo Vigor.

Para los propósitos de este trabajo se requerían condiciones de deterioro tales que disminuyeran el vigor de la semilla almacenada sin afectar en forma significativa la germinación de la misma, por lo que se exploraron diversas combinaciones de temperatura y H.R. Estas se agruparon en tres experimentos cuyos resultados se muestran a continuación:

3.1.2.1 Experimento I.

Dado que se tenían antecedentes en el laboratorio de la relativa facilidad con que la semilla de trigo se veía invadida por hongos de almacén a temperaturas y humedades relativas altas (48), se planearon los experimentos ajustando de tal manera temperatura, humedad y tiempos, para evitar la invasión de la semilla por hongos de almacén.

El primer experimento, fue realizado utilizando una humedad relativa baja, del 75% en una amplia gama de temperaturas. El criterio del tiempo se manejó en sentido inverso a la temperatura, esto es, a mayor temperatura menor tiempo de tratamiento y viceversa.

En los resultados mostrados en la tabla 3.2, se puede observar que a temperaturas relativamente bajas de 20 y 30°C, el porcentaje de germinación a los 3 y 7 días no se ve afectado ni aún a tiempos largos de tratamiento; no así la velocidad de germinación la cual se ve ligeramente retrasada, manifestándose en un coeficiente de velocidad de germinación (CVG) menor que para el control. Sin embargo, en los dos tratamientos observamos que con el transcurso del tiempo de deterioro, el valor del CVG, aunque ligeramente menor que el control, permanece apreciablemente constante.

En cuanto al peso seco de partes aéreas, con el cual medimos el vigor de la plántula, a los siete días de imbibición, observamos que éste está dentro del margen de error del control.

A temperaturas altas de 40°, 42° y 45°C, se observa que a medida que transcurre el tiempo de tratamiento, el porcentaje de germinación a los tres días disminuye apreciablemente así como la velocidad de germinación, que se manifiesta por una ligera y gradual disminución en el CVG. El porcentaje de germinación a los siete días, es decir la

TEMPERATURA	TIEMPO (días)	$\% \text{ CH}^1 \pm \sigma$	$\% \text{ DE GERMINACION} \pm 2\%^{(2)}$ A LOS DIAS :				CVG	PESO ³ SECO mg/Ind $\pm \sigma$
			1	2	3	4		
Control		10.75 \pm 0.05	27	97	99	99	0.57	7.4 \pm 0.2
20°	15	14.0 \pm 0.3	10	90	97	97	0.51	N.D. ⁵
	30	14.8 \pm 0.1	10	88	97	97	0.50	7.1 \pm 0.4
	45	15.5 \pm 0.2	12	89	97	97	0.51	N.D.
30°	10	13.8 \pm 0.0	20	73	97	97	0.49	7.3 \pm 0.2
	20	14.0 \pm 0.1	20	75	97	97	0.49	N.D.
	30	14.2 \pm 0.1	20	75	96	97	0.50	7.3 \pm 0.6
40°	3	13.4 \pm 0.0	15	80	98	98	0.53	7.2 \pm 0.2
	6	13.6 \pm 0.1	22	70	95	98	0.49	8.1 \pm 0.5
	10	13.3 \pm 0.2	17	68	85	95	0.50	7.4 \pm 0.2
42°	10	13.7 \pm 0.2	17	66	85	95	0.49	7.7 \pm 0.4
	17	16.1 \pm 3.2	10	67	83	94	0.48	7.7 \pm 0.4
	28	13.3 \pm 0.0	8	62	80	92	0.47	N.D.
45°	2	13.1 \pm 0.1	32	85	95	94	0.56	7.9 \pm 0.4
	4	13.0 \pm 0.1	22	77	92	96	0.52	8.0 \pm 0.3
	6	12.6 \pm 0.3	15	76	82	93	0.53	7.5 \pm 0.4

Tabla 3.2 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO I. (75% H.R.)

- 1) $\%$ de contenido de Humedad de la semilla, promedio de 4 repeticiones por duplicado.
- 2) promedio de al menos 3 repeticiones con σ máxima = $\pm 2\%$ (semilla secada a TA/24 h)
- 3) promedio de al menos 3 repeticiones (determinada a 60°C/3 días).
peso seco de partes aéreas, 50 ind/rep.
- 4) $\%$ de viabilidad
- 5) N.D. no determinado

viabilidad de las semillas, se ve ligeramente disminuido con el transcurso del tiempo de envejecimiento, aunque nunca es mayor del 7%. El vigor de la plántula, manifestado como aumento de peso seco de las partes aéreas a los siete días de imbibición, no se ve disminuido aún a tiempos largos de tratamiento, por el contrario, a 45° a 2 y 4 días y 40° y 6 días se ve ligeramente aumentado con respecto al control.

Los resultados anteriores indican que los tratamientos aquí utilizados, si bien son capaces de disminuir la velocidad de germinación de las semillas sin disminuir apreciablemente su viabilidad, no lo son para disminuir también el vigor de las mismas.

El contenido de humedad de la semilla en todos los tratamientos es bastante bajo, observándose contra lo esperado, que el contenido de humedad de la semilla es menor a temperaturas altas para una misma humedad relativa, lo cual sugiere una falla en el sellado de la cámara de deterioro, que a mayor temperatura se hace ineficiente para mantener la atmósfera húmeda constante, por lo que para los experimentos posteriores se hizo especial hincapié en el sellado hermético de las cámaras.

Ya que el tratamiento de 75% H.R. aún a temperaturas altas y en los tiempos límites a la aparición de hongos de almacén, no produjo la disminución en el vigor, se probó con una H.R. del 100%.

3.1.2.2. Experimento II.

Se utilizó una H.R. del 100% y temperaturas de 5°, 20° y 30°C a tiempos bastante cortos, ya que la alta humedad que adquiere la semilla, propicia la aparición de hongos de almacén.

En la tabla 3.3, se muestran los resultados de este experimento, donde se observa que en ningún caso existe una disminución apreciable ni en la velocidad de germinación (CVG) ni en el porcentaje de

TEMPERATURA	TIEMPO (días)	X C.H. ¹ ± σ	X DE GERMINACION ² ± 2Z a los días:				CVG	PESO ³ SECO mg/ind ± σ
			1	2	3	7 ⁴		
Control 5°	10	10.75 ± 0.05	27	97	99	99	0.57	7.4 ± 0.2
	15	23.8 ± 0.3	30	90	95	95	0.57	N.D. ⁵
	20	27.1 ± 0.8	16	89	98	98	0.52	N.D.
20°	1	29.5 ± 0.4	17	92	98	98	0.52	7.7 ± 0.3
	2	15.5 ± 0.3	12	80	98	98	0.49	7.4 ± 0.5
	3	18.6 ± 0.7	37	90	95	98	0.60	8.8 ± 0.2
30°	1	20.0 ± 0.4	25	83	93	99	0.54	8.4 ± 0.2
	2	16.0 ± 0.2	20	83	98	98	0.51	7.5 ± 0.3
	3	19.3 ± 0.4	40	92	95	97	0.62	8.6 ± 0.7
		20.6 ± 0.4	22	82	93	97	0.53	8.3 ± 0.5

Tabla 3.3 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO II. (100Z H.R.)

- 1) Contenido de humedad de la semilla, promedio de 4 repeticiones por duplicado.
- 2) promedio de al menos 3 repeticiones con σ máxima = ± 2% (semilla secada a TA/24 h)
- 3) promedio de al menos 3 repeticiones (determinada a 60°C/3 días).
peso seco de partes ñereas, 50 ind/rep.
- 4) % de viabilidad
- 5) N.D. no determinado.

germinación a los 3 y 7 días, ni en el vigor de la plántula (peso seco de partes aéreas).

En dos casos se observa un ligero aumento en el CVC del 5.3 y 8.8% para 20° y 2 días y para 30° y 2 días respectivamente, que corresponden a un marcado aumento en el peso seco de partes aéreas de la plántula a los siete días de imbibición de 1.4 y 1.2 mg que representan un 19 y 16% con respecto al control.

Estos resultados sugieren una posible invigorización (23) de la semilla debido al alto contenido de humedad, que en corto plazo y a temperaturas óptimas induce a la semilla a germinar más rápidamente que el control. Al parecer, con este tratamiento se ponen en marcha los mecanismos de la germinación, que sin dañarse al ser secada la semilla y volverse a imbibir, permiten que la germinación prosiga su curso normalmente y adelantada en el tiempo. Esta pronta germinación se manifiesta en un aumento en la acumulación de peso seco en la canopia medido a los siete días, lo cual la hace una plántula más capacitada para sobrevivir en un medio adverso.

3.1.2.3. Experimento III.

En este experimento se probó con una humedad relativa de 85% que permitiera aumentar el tiempo de tratamiento y la temperatura.

En la tabla 3.4, se muestra que a las temperaturas de 20° y 30°C, la germinación al tercer día disminuye ligeramente al transcurrir el tiempo de tratamiento, al igual que la velocidad de germinación, aunque el CVC permanece apreciablemente constante. La viabilidad de la semilla disminuye ligeramente un máximo del 5% para 30 días de tratamiento a 30°C, mientras que el vigor para ambas temperaturas, medido como peso seco de partes aéreas a los 7 días de imbibición de la semilla, permanece dentro de los límites del control, observándose

TEMPERATURA	TIEMPO (días)	%C.H. ¹ ± σ	% DE GERMINACION ² ± 2% a los días:				CVG	PESO ³ SECO mg/ind ± σ
			1	2	3	7 ⁴		
Control 20°		10.75 ± 0.05	27	97	99	99	0.57	7.4 ± 0.2
	5	16.7 ± 0.2	0	87	98	98	0.47	7.5 ± 0.6
	10	17.0 ± 0.2	N.D. ⁵	N.D.	N.D.	98	N.D.	7.8 ± 1.1
	15	17.4 ± 0.1	N.D.	N.D.	N.D.	98	N.D.	8.0 ± 0.2
30°	6	16.2 ± 0.6	20	85	97	98	0.52	7.3 ± 0.1
	9	15.9 ± 0.2	18	90	98	98	0.53	7.1 ± 0.5
	16	16.4 ± 0.3	18	86	96	96	0.52	8.3 ± 0.3
	30	16.9 ± 0.3	15	80	95	95	0.50	8.4 ± 0.7
42°	5	14.3 ± 0.4	18	88	96	96	0.53	7.2 ± 0.3
	10	13.3 ± 0.4	15	70	94	95	0.47	8.0 ± 0.8
	17	15.1 ± 0.5	5	50	80	88	0.43	6.7 ± 0.2
	21	16.0 ± 0.4	0	0	0	0	-	-

Tabla 3.4 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO III. (85% H.R.)

- 1) Contenido de humedad de la semilla, promedio de 4 repeticiones por duplicado.
- 2) Promedio de al menos 3 repeticiones con σ máxima = ± 2% (semilla secada a Ta/24 h)
- 3) Promedio de al menos 3 repeticiones (determinadas a 60°C /3 días)
- 4) % de visibilidad
- 5) N.D. no determinado.

un ligero aumento a tiempos largos de los dos tratamientos. Este aumento corresponde a una pérdida de la viabilidad de la semilla, la cual puede contribuir a eliminar individuos pequeños de la población y aumentar el peso seco promedio de la población muestreada.

Para el tratamiento de mayor temperatura (42°C), al transcurrir el tiempo de tratamiento, se observó una marcada disminución en la germinación a los 3 días así como una disminución en la velocidad de germinación, disminuyendo el CVG considerablemente a los 17 días de tratamiento. En este mismo lapso de tiempo, la viabilidad disminuye hasta un 12% llegando bruscamente a la total pérdida de la viabilidad a los 21 días de tratamiento.

En cuanto al contenido de humedad de la semilla, ésta aumentó con el tiempo de almacenamiento, y es menor a la misma temperatura que para el tratamiento de 75% H.R. como era lo esperado. Sin embargo, se observó que la desviación estándar en el contenido de humedad a 85% H.R. es mayor que para la correspondiente temperatura a 75% H.R. Este último hecho se reflejó en una mayor desviación estándar en el peso seco de la población muestreada al 85% que al 75% H.R. a las mismas temperaturas. Estos resultados nos condujeron a suponer que la forma de los contenedores no permitía que la población de semillas tomara humedad homogéneamente, ni que todas las semillas tuvieran la misma disponibilidad de O₂, creándose microambientes diferentes dentro del mismo contenedor que hacían que la población de semillas se deteriorara heterogéneamente.

El vigor medido como peso seco de partes aéreas a los siete días de imbibición, también disminuyó drásticamente a los 17 días de tratamiento.

Los resultados anteriores indicaban, que se podía obtener semilla

deteriorada, de bajo vigor pero con viabilidad similar a la del control, entre los 10 y 17 días de tratamiento a 85% H.R. y 42°C. Estas condiciones fueron las que se escogieron para obtener las semillas deterioradas.

3.1.3 Optimización de las Condiciones de Almacenamiento para Obtener Semillas Deterioradas.

A la luz del experimento III, se tenían las condiciones tentativas de deterioro de 85% H.R. y 42°C entre 10 y 17 días de tratamiento, que permitirían obtener una población de semillas deterioradas con una viabilidad semejante al control. Con la finalidad de encontrar el período de tiempo exacto que permitiera obtener las semillas con el grado de deterioro deseado, se probaron dos métodos, los cuales difieren únicamente en cuanto al contenido inicial de humedad de la semilla. En el método 1, el contenido de humedad de la semilla se equilibraba lentamente con la cámara de deterioro, mientras que por el método 2, el contenido de humedad de la semilla se ajusta desde el principio a un 17% (ver material y métodos). Por lo demás, los dos métodos son similares, ya que en ambos se mantiene una humedad relativa del 85% y una temperatura de 42°C y las semillas colocadas en monocapa para facilitar una humectación y disponibilidad de oxígeno lo más homogénea posible.

En las tablas 3.5 y 3.6 se muestran los resultados de la caracterización de las semillas deterioradas por los métodos 1 y 2 respectivamente. En ambos métodos se observa que al aumentar el tiempo de tratamiento, disminuyen: la velocidad de germinación, medida como una disminución en el CVC; el porcentaje de germinación tanto a los 3 como a los 7 días y; el vigor, medido como aumento de peso seco en

TIEMPO días	X C.H. ² ± σ	X GERMINACION ACUMULADA ³ ± 2X a los días:				CVG	PESO SECO ⁴ mg / canopia
		1	2	3	7		
0 ¹	10.7 ± 0.0	22	97	99	99	0.57	N.D.
3	15.3 ± 0.1	18	88	98	98	0.52	10.1
6	15.3 ± 0.1	15	70	94	94	0.48	9.51
8	15.3 ± 0.0	0	60	90	90	0.43	9.03
9	15.6 ± 0.1	0	28	60	88	0.39	8.05
10	15.7 ± 0.1	0	15	30	84	0.40	8.29
11	15.5 ± 0.1	0	10	25	75	0.38	6.51
12	15.5 ± 0.1	0	0	20	69	0.33	5.04

Tabla 3.5 EFECTO DEL TIEMPO DE DETERIRO EN LA VELOCIDAD DE GERMINACION, VIABILIDAD Y VIGOR DE SEMILLA DETERIORADA POR EL METODO 1. (85% H.R.; 42°C; 11% CH)

- 1) Tiempo cero es el control
- 2) Contenido de Humedad, cada número es el promedio de 4 repeticiones por duplicado.
- 3) Promedio de dos repeticiones con σ máx ± 2X. Cada repetición fue de 100 ind.
- 4) Promedio de dos repeticiones. Cada repetición fue de 25 ind.

TIEMPO DIAS	% C.H. ² ± σ	% GERMINACION ACUMULADA ³ ± 2% a los días:				CVG	PESO SECO ⁴ mg/canopia
		1	2	3	7		
0 ¹	17.2 ± 0.0	20	90	98	98	0.53	10.10
1	24.4 ± 0.2	15	90	96	96	0.52	9.31
2	24.8 ± 0.0	18	89	95	95	0.53	8.70
4	23.3 ± 0.2	13	79	83	90	0.50	8.10
5	22.1 ± 0.0	0	0	15	60	0.33	6.31
6	23.9 ± 0.0	0	0	0	20	-	5.10

Tabla 3.6 EFECTO DEL TIEMPO DE DETERIORO EN LA VELOCIDAD DE GERMINACION, VIABILIDAD Y VIGOR DE SEMILLA DETERIORADA POR EL METODO 2. (85% H.R.; 42°C; 17.2% C.H. ajustada).

- 1) Tiempo cero es el control, con humedad ajustada al 17% y guardada a 4°C por 24 h.
- 2) Contenido de humedad, cada número es el promedio de dos repeticiones.
- 3) Promedio de dos repeticiones. Cada repetición fue de 50 ind.
- 4) Promedio de dos repeticiones. Cada repetición fue de 25 ind.

canopia al 7º día de iniciada la imbibición. Sin embargo, en el deterioro logrado por el método 2 éstos parámetros disminuyen más rápidamente con el tiempo que por el método 1.

Por el método 1, la semilla que presenta las características de producir plántulas de bajo vigor con velocidad de germinación y viabilidad semejantes al control, es la tratada durante 8 días, mientras que por el método 2 es la tratada por 4 días.

De acuerdo con estos resultados, se seleccionó deteriorar la semilla por el método 2 durante 4 días, es decir, se escogió ajustar el contenido de humedad inicial de la semilla a un 17% y deteriorarla a 85% H.R., 42°C y cuatro días de tratamiento. Estas fueron las condiciones de envejecimiento acelerado que se escogieron para obtener la semilla deteriorada que se utilizó en el resto del trabajo.

Una vez que se obtuvo el material biológico con las características deseadas de vigor y viabilidad, se procedió a estudiar la influencia de la velocidad de movilización de reservas en la capacidad de la plántula para establecerse como organismo autotrófico.

3.2 RESULTADOS BIOQUIMICOS Y FISIOLÓGICOS

3.2.1 Velocidad de Movilización de Reservas en Plántulas Control y de Bajo Vigor.

Después que ha germinado, el embrión inicia un periodo de crecimiento heterotrófico dependiente únicamente de la movilización de las reservas almacenadas en el endospermo, durante el cual, debe de capacitarse estructural, morfológica, fisiológica y bioquímicamente para establecerse como organismo autótrofo. Para determinar la duración de éste periodo se determinó la cinética de movilización de las principales reservas, ya que se espera que cuando éstas se hayan agotado, la plántula haya adquirido o esté adquiriendo la capacidad para establecerse como organismo autótrofo.

3.2.1.1 Cinética de Movilización de las Reservas de Plántulas de Trigo Control y de Bajo Vigor.

Durante el crecimiento heterotrófico, las plántulas crecen a expensas del material de reserva almacenado en el endospermo, por lo que se midió la cinética de movilización de reservas como la disminución de peso seco en el endospermo y acumulación del mismo en raíz y canopia. Este experimento se realizó en plántulas de trigo control y de bajo vigor crecidas en la luz y regadas únicamente con agua desionizada.

En los resultados mostrados en la fig. 3.1, se puede observar que durante los primeros días de crecimiento, del 4º al 8º días para coleoptilo (fig. 3.1 A) y del 4º al 10º día para raíz (fig. 3.1 B), la acumulación de materia seca es mayor en plántulas control que en las provenientes de semilla deteriorada, llegando a igualarse e inclusive superando las de bajo vigor a las de alto vigor en días posteriores.

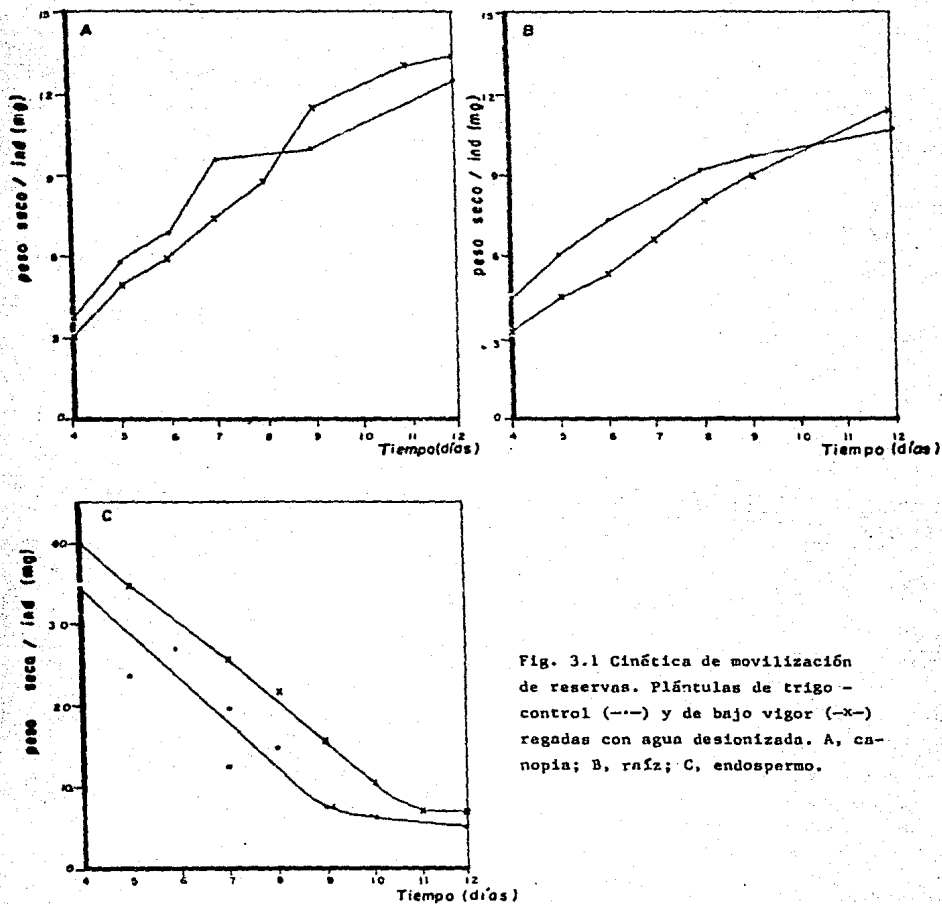


Fig. 3.1 Cinética de movilización de reservas. Plántulas de trigo - control (—) y de bajo vigor (-x-) regadas con agua desionizada. A, cotiledón; B, raíz; C, endospermo.

En cuanto al consumo del material de reserva, se puede observar que éste (fig. 3.1 C) es consumido a una velocidad constante y similar hasta el 8º día para endospermos provenientes de semilla control y hasta el 10º día para los de semilla deteriorada. Los resultados anteriores sugieren que hasta los 8 días de crecimiento, la menor capacidad de acumulación de materia seca tanto en raíz como en coleoptilo por las plántulas de bajo vigor, es debida a un retraso en la movilización de la reserva almacenada en el endospermo.

Por otra parte, también sugiere que el aumento en peso seco, tanto en raíz como en canopia, durante los primeros ocho días de iniciada la imbibición para plántulas control y 10 días para plántulas de bajo vigor, se debe fundamentalmente a los factores tróficos provenientes de la hidrólisis del material de reserva. De acuerdo con esto, se puede deducir que la transición de la heterotrofia a la autotrofia se produce alrededor del 8º para plántulas control y 10º día para plántulas de bajo vigor, en estas condiciones.

3.2.1.2 Efecto de las Sales Minerales en la Cinética de Crecimiento de Plántulas de Trigo Control y de Bajo Vigor.

Una vez demostrado que las plántulas provenientes de semilla control manifestaban una mayor velocidad de crecimiento, medido como acumulación de peso seco, que las plántulas de semilla deteriorada, se estudió el efecto, por un lado, de las sales minerales (-Ni), y por otro, del nitrógeno inorgánico (Ni) sobre los patrones de crecimiento. Para lograr este objetivo, se crecieron plántulas de trigo control y de bajo vigor en la luz, regándolas diariamente con una solución nutritiva de Hoagland sin nitratos ($Hg-NO_3^-$) (efecto de sales minerales) y con solución nutritiva de Hoagland con nitratos ($Hg+NO_3^-$) (efecto del Ni).

Para efectos de comparación, en la fig. 3.2 y 3.3 se muestran los patrones de crecimiento de plántulas control y de bajo vigor respectivamente, en donde puede observarse que durante el crecimiento heterotrófico el desarrollo de la plántula control (7 d) o de la de bajo vigor, es independiente de los nutrientes exógenos adicionados. A partir de este momento, depende del aporte exógeno de sales minerales. Una vez que se han agotado las reservas del endospermo, la capacidad para acumular peso seco es similar en plántulas control y de bajo vigor (fig. 3.4). Este patrón se observa tanto en raíz (fig. 3.4B) como en canopia (fig. 3.4 A).

Cuando se determina el patrón de acumulación de peso seco en plántulas regadas con sales minerales entre las cuales se incluye el NO_3^- ($\text{Hg}+\text{NO}_3^-$ fig. 3.5), la raíz de ambos tipos de plántulas acumulan peso seco con la misma eficiencia (fig. 3.5.B), mientras que la canopia de plántulas de bajo vigor nunca alcanzan la eficiencia presentada por el control (fig. 3.5 A).

Los resultados de las figuras 3.4 y 3.5, se interpretaron como que una vez alcanzada la autotrofia y en ausencia de Ni exógeno, las plántulas control y las de bajo vigor, son igualmente eficientes en acumular materia seca (fig. 3.4), lo que sugiere que la capacidad para fijar CO_2 es similar en ambos casos. Sin embargo, cuando el Ni se encuentra en el medio de crecimiento las plántulas control acumulan mayor cantidad de peso seco que las deterioradas. Esto último, podría deberse al hecho de que en plántulas de bajo vigor la asimilación del nitrógeno y/o la integración del mismo al metabolismo general esté disminuido con respecto al control.

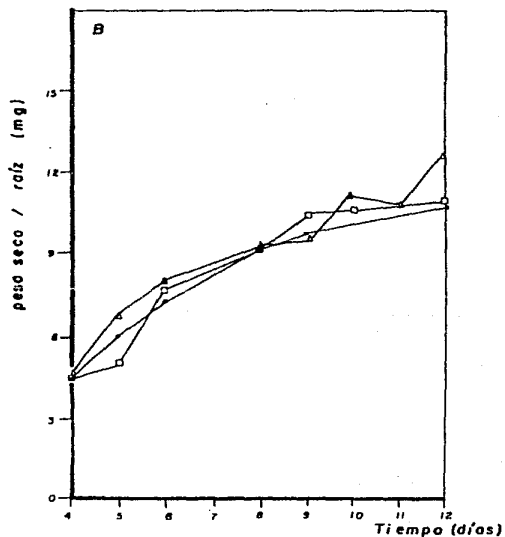
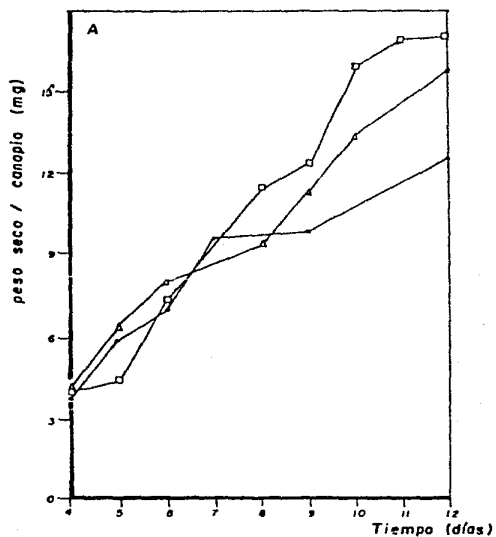


Fig. 3.2 EFECTO DE LAS SALES MINERALES EN EL CRECIMIENTO DE PLANTULAS DE TRIGO CONTROL.

(—●—) Riego con agua; (---□---) riego con Hg-NO₃; (—△—) riego con Hg + NO₃.

A, canopia; B, raíz.

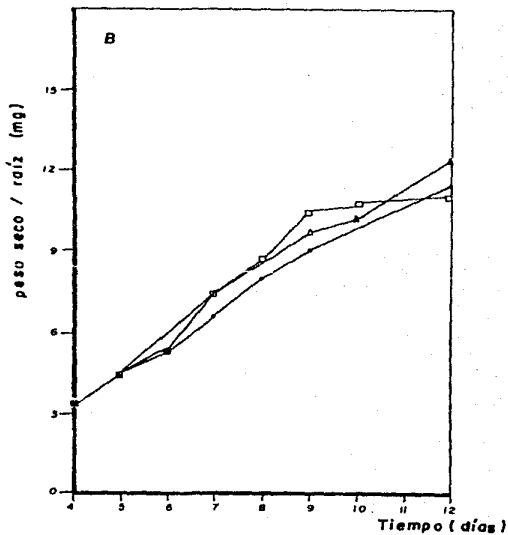
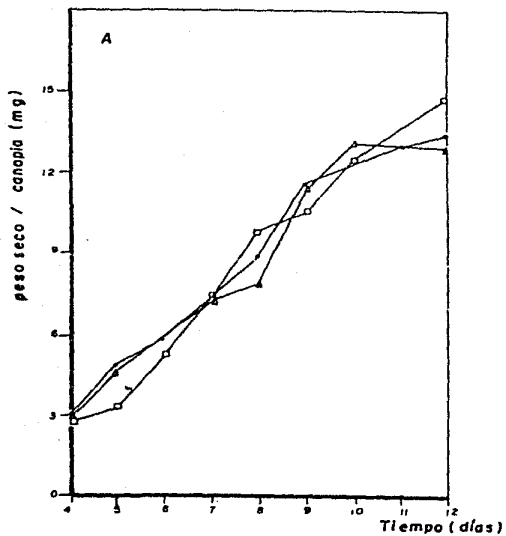


Fig. 3.3 EFECTO DE LAS SALES MINERALES EN EL CRECIMIENTO DE PLANTULAS DE TRIGO DE BAJO VIGOR.
 (—○) Riego con agua; (—▲) riego con Hg-NO₃; (—□) riego con Hg + NO₃.
 A, canopia; B, raíz.

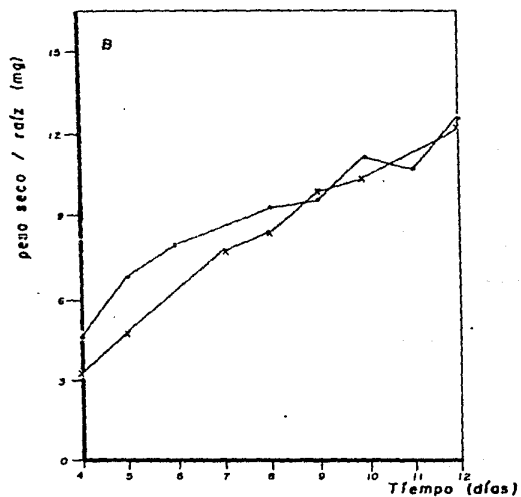
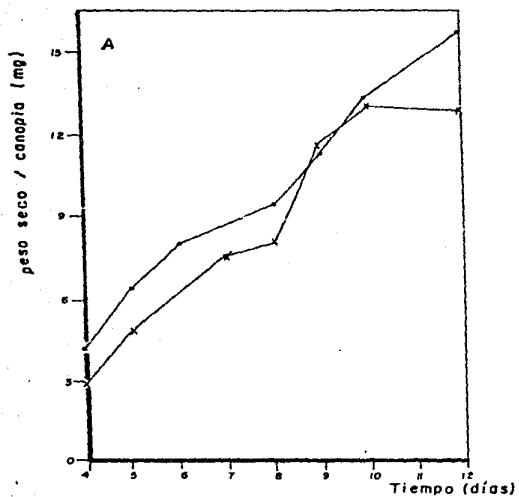


Fig. 3.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE TRIGO REGADAS CON $Hg - NO_3^-$.
 (—) Plántulas control; (—x) plántulas de bajo vigor.
 A, canopia; B, raíz.

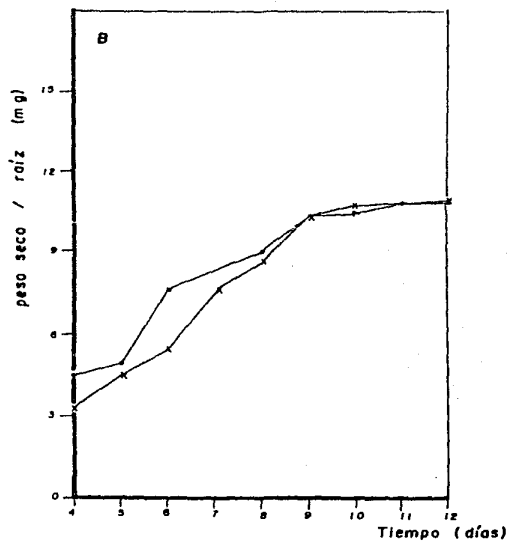
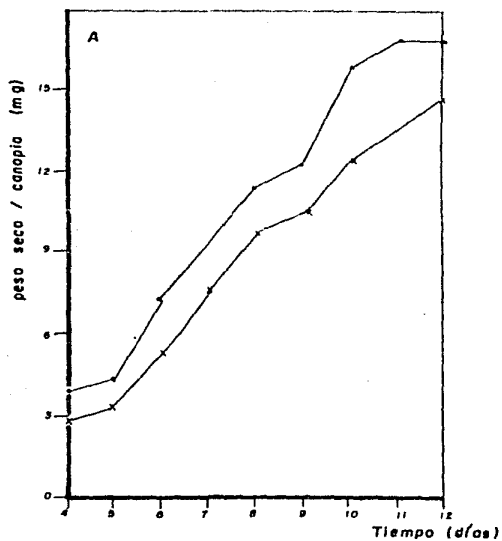


Fig. 3.5 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE PLANTULAS DE TRIGO REGADAS CON $Hg + NO_3^-$.
 (—○—) Plántulas control; (—×—) plántulas de bajo vigor.
 A, canopia; B, raíz.

3.2.2. Efecto del Deterioro en la Integración del Metabolismo Nitrogenado al Metabolismo Hidrocarbonado.

Para estudiar la integración de los metabolismos nitrogenado e hidrocarbonado, se optó por determinar el contenido de proteína en canopias de plántulas de trigo control y de bajo vigor, ya que es en ésta parte de la plántula donde se manifiesta más evidentemente tanto el efecto del deterioro durante el crecimiento heterotrófico así como el del aporte nitrogenado durante el crecimiento autotrófico.

La síntesis de proteínas es un evento que requiere además de una fuente de nitrógeno, una de energía y una de esqueletos hidrocarbonados para su eficiente funcionamiento. Estos dos últimos son proporcionados durante el periodo heterotrófico por la hidrólisis del material de reserva y durante el periodo autotrófico por la fotosíntesis. Es por ello que la síntesis de proteínas es un buen indicador de la integración del metabolismo nitrogenado e hidrocarbonado. Llamaremos proteína heterotrófica a aquella sintetizada a partir del nitrógeno presente en el material de reserva y proteína autotrófica a la sintetizada a partir de una fuente exógena de nitrógeno.

3.2.2.1 Efecto del Deterioro en la Síntesis de Proteína Heterotrófica.

Para estudiar este efecto, se determinó el contenido de proteína en canopias de plántulas de trigo control y de bajo vigor, regadas con una solución nutritiva de Hg-NO_3^- crecidas en la luz. La proteína total se extrajo de material seco en 0.8 N de NaOH y se determinó por el método de Peterson, o bien, la proteína soluble se extrajo de material fresco en el buffer de extracción (ver material y métodos) determinados de la misma manera.

La proteína total en canopias de plántulas de trigo control es el doble de la proteína soluble (fig. 3.6 A) y ambos patrones mostraron el mismo comportamiento durante todo el periodo de tiempo estudiado. Por esta razón las determinaciones posteriores se hicieron en base a la proteína soluble.

Los patrones de síntesis de proteína soluble de canopias control y de bajo vigor (fig. 3.6 B), muestran tres fases. Una primera fase de síntesis lenta de proteínas del 4º al 6º día; una segunda fase del 6º al 10º día a una mayor velocidad para canopias de bajo vigor que las control y; una tercera fase estacionaria después del 10º día. La cantidad de proteína soluble sintetizada por las canopias de bajo vigor es menor que el control hasta el 8º día de iniciada la imbibición, para posteriormente igualarse (fig. 3.6 B).

Los resultados anteriores sugieren que la síntesis de proteína heterotrófica se encuentra disminuída con respecto al control. Esta menor cantidad de proteína manifiesta una falta de coordinación y/o integración entre el metabolismo hidrocarbonado y nitrogenado en canopias de bajo vigor durante el periodo heterotrófico (antes de los 9 d).

3.2.2.2 Efecto del Deterioro en la Síntesis de Proteína Autotrófica.

La proteína autotrófica se determinó como la diferencia en el contenido de proteína de canopias de trigo regadas con disolución nutritiva de $Hg+NO_3^-$ menos la proteína de canopias de plántulas regadas con $Hg-NO_3^-$.

Para esto, se crecieron en la luz plántulas de trigo control y deterioradas regándose diariamente con una solución nutritiva de $Hg+NO_3^-$. La proteína total y soluble, se extrajeron y determinaron en

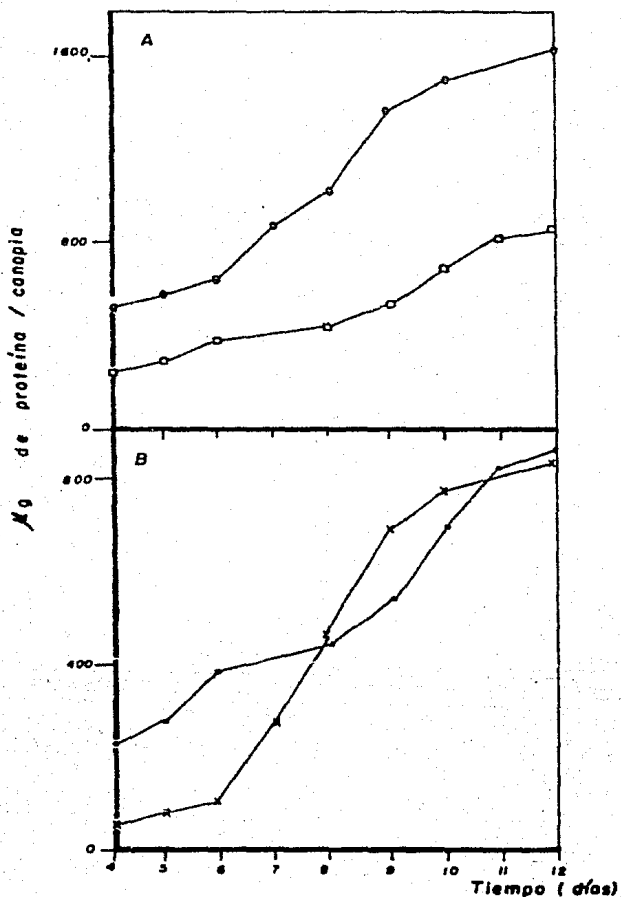


Fig. 3.6 VARIACION EN EL CONTENIDO DE PROTEINA HETEROTROPICA EN CANOPIAS CONTROL Y DE BAJO VIGOR. A, Contenido de proteínas en canopias control regadas con $Hg-NO_3^-$: (—○—) proteína total; (—□—) proteína soluble. B, contenido de proteína soluble en canopias regadas con $Hg-NO_3^-$ (—) canopias control; (—x—) canopias de bajo vigor. Cada punto es la media de por lo menos dos experimentos independientes realizados por duplicado.

la forma anteriormente descrita.

En la fig. 3.7 A, se puede observar que el contenido de proteína tanto total como soluble en canopias control, aumenta con la edad de la plántula, siendo del 4º al 6º día el doble de la segunda. Esta relación aumenta con la edad de la plántula hasta ser el triple del 9º día en adelante. Sin embargo, ya que las dos siguen la misma tendencia, se decidió utilizar con fines comparativos el contenido de proteína soluble, por ser de más fácil extracción.

En el patrón de contenido de proteína soluble en canopias control y de bajo vigor, regadas con NO_3^- (fig. 3.7 B) se observó que la cantidad de proteínas es siempre mayor para canopias control que para las de bajo vigor.

La proteína autotrófica se definió como la diferencia entre el contenido de proteínas en canopias tratadas con NO_3^- y sin ellos, se observó que la proteína autotrófica soluble en canopias control (fig. 3.7 C) se sintetizaba a partir del 7º día en cantidades cada vez mayores, mientras que en canopias de bajo vigor (fig. 3.7 D) no aparece nada de proteína autotrófica, al menos durante el periodo de tiempo estudiado.

El hecho de que las canopias de plántulas de bajo vigor no sintetizan proteína autotrófica soluble, sugiere que el mecanismo de asimilación del Ni no funcione o lo haga en forma ineficiente. En este trabajo, se decidió evaluar la segunda posibilidad, ya que las canopias de bajo vigor son capaces de fotosintetizar en ausencia de NO_3^- (acumular peso seco). Se eligió como marcador del proceso de asimilación del Ni a la Nitrato Reductasa (NR), enzima responsable de la asimilación del NO_3^- y reguladora de la vía (12,30).

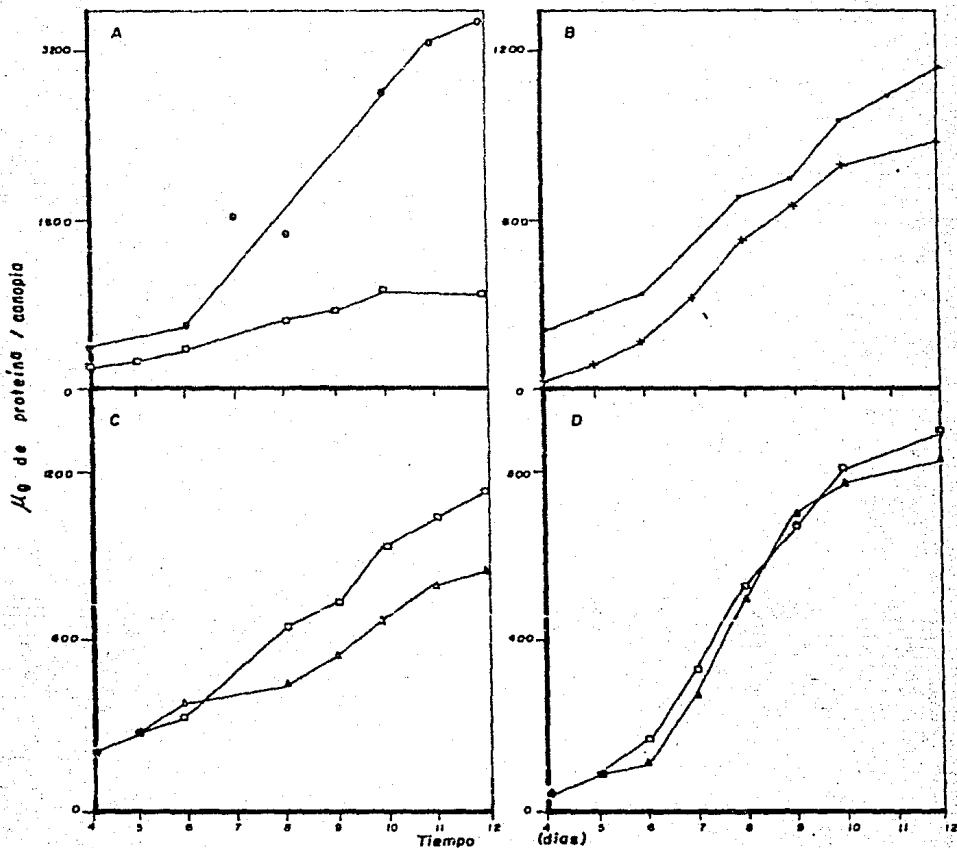


Fig. 3.7 VARIACIONES EN EL CONTENIDO DE PROTEINA AUTOTROFICA EN PLANTULAS DE TRIGO, CON LA EDAD A Canopias control regadas con $Hg+NO_3^-$: (\blacktriangle) proteína total; (\square) proteína soluble. B, proteínas soluble en canopias regadas con $Hg+NO_3^-$: (\blacktriangle) control; (\blackstar) bajo vigor. Proteína soluble en canopias control (C) y de bajo vigor (D) regadas con: (\blacktriangle) $Hg+NO_3^-$; (\square) $Hg+NO_3^-$. Cada punto es la media de por lo menos dos experimentos independientes realizados por duplicado.

3.2.3 Actividad de la NR.

El estudio de la actividad de la NR (ANR) se llevó a cabo a la luz de dos experimentos diferentes: por un lado, se determinó la capacidad de inducción de ANR induciendo la actividad por sustrato 24 h antes de la cosecha, mediante el riego con NO_3^- ; por otra parte, se determinó la capacidad de acumulación de ANR induciendo la actividad a partir del 4º día de iniciada la imbibición. Ambos experimentos fueron llevados a cabo tanto en plántulas control como en las de bajo vigor y correlacionadas con sus respectivos niveles de nitratos.

3.2.3.1 Efecto del Deterioro de la Capacidad de Inducción de ANR y Captación de Nitratos.

En la fig. 3.8 se puede observar que la capacidad de inducción de ANR que presentan las plántulas control ó deterioradas aumenta a medida que la plántula se desarrolla, aunque la actividad de la enzima siempre es menor en las de bajo vigor que en las control. En ambos casos también se observa un máximo de actividad a los 8 días después de iniciada la imbibición. A partir de este tiempo la tendencia es a disminuir. Este patrón se observa independientemente de si la actividad se expresa por canopia (fig. 3.8 A) ó por mg de proteína soluble (fig. 3.8.B) ó por mg de peso seco (fig. 3.8.C).

Ya que la NR es una enzima inducida por su sustrato, se determinaron paralelamente los niveles de nitratos, tanto en canopias control como de bajo vigor tratadas durante 24 h con nitratos. En la fig. 3.9 A se muestran los niveles de NO_3^- /canopia en función de la edad de la plántula, observándose que tanto en canopias control como de bajo vigor, la capacidad para captar nitratos (en 24 H) aumenta con la edad de la plántula hasta el 10º día aproximadamente, para después permane-

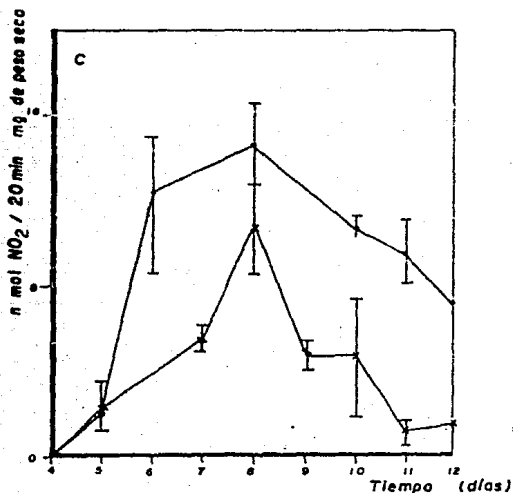
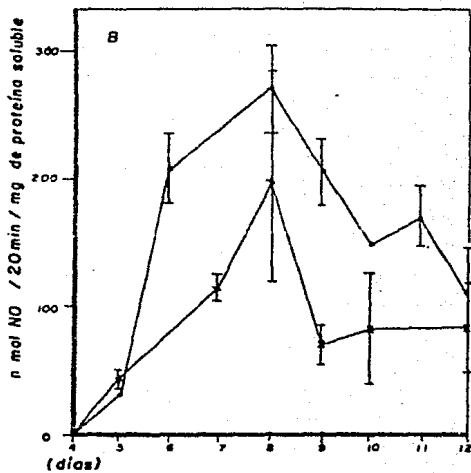
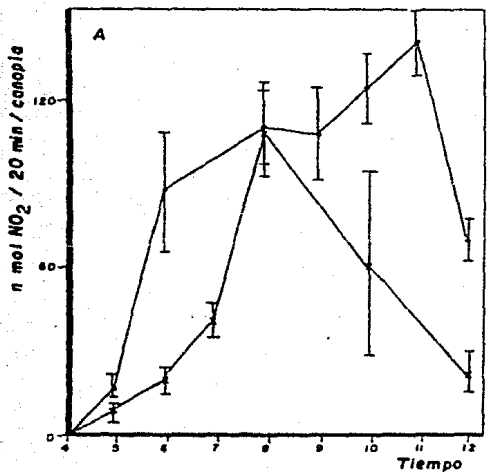


Fig. 3.9 CINÉTICA DE INDUCCIÓN DE ANR. (—) control; (—▲—) bajo vigor. A, expresada por canopía; B, por mg de proteína soluble; C, por mg de peso seco.

Cada punto del control, es la media de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Cada punto de bajo vigor, es la media de por lo menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. Lo anterior es válido para las figs. 3.9, 3.10 y 3.11.

Las barras verticales, representan la desviación estándar (1).

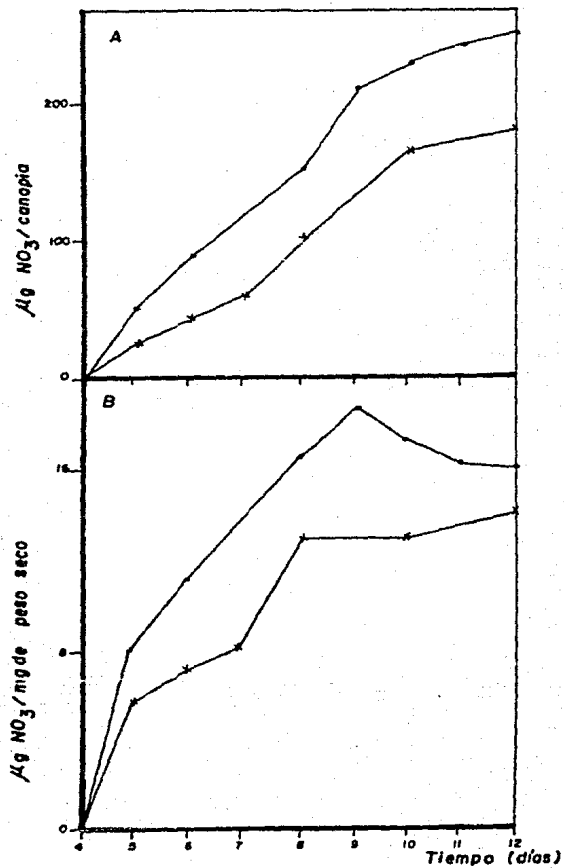


Fig. 3.9 VARIACION DE LA CAPACIDAD DE TOMA DE NO_3^- CON LA EDAD DE LA PLANTULA.

A, expresada por canopia; B, por mg de peso seco. (—○—) canopias control; (---×---) canopias de bajo vigor.

cer constante. La cantidad de nitratos captada en 24 h, es menor para canopias de bajo vigor que para las control, aunque esta diferencia es menor del 4º al 8º día. Resultados semejantes se obtienen al graficar los niveles de nitratos/mg de peso seco (fig. 3.9.B).

3.2.3.2 Efecto del Deterioro en la Capacidad de Acumulación de ANR y de Nitratos.

Para determinar la capacidad de acumulación de ANR por plántulas de trigo control y de bajo vigor, se utilizaron plántulas que a partir del 4º día de iniciada la imbibición fueron regadas con solución nutritiva de $Hg+NO_3^-$. Los resultados se muestran en la fig. 3.10. Cuando la actividad se expresa por canopia (fig. 3.10 A), la acumulación de ANR aumenta con la edad de la plántula hasta los 11 días tanto para canopias control como de bajo vigor. La ANR acumulada alcanzada por las plántulas deterioradas es siempre menor que para plántulas control. Esta diferencia se hace evidente a partir del 6º día de edad, ya que las plántulas control da 5 días tienen la misma ANR que las de bajo vigor.

Si la actividad se expresa por mg de proteína soluble (fig. 3.10.B) ó por mg de peso seco (fig. 3.10.C), la capacidad de acumulación de ANR, presenta dos fases distintas: del 5º al 8º día, la ANR se incrementa con la edad de la plántula y después disminuye. Esto sugiere que antes del 8º día la capacidad de acumulación de ANR se incrementa a mayor velocidad que la proteína soluble ó el peso seco de la plántula y que después del 8º día sucede lo contrario, o bien aumenta en mayor proporción la proteína soluble y el peso seco que la ANR.

Los niveles de nitratos acumulados también aumentan con la edad

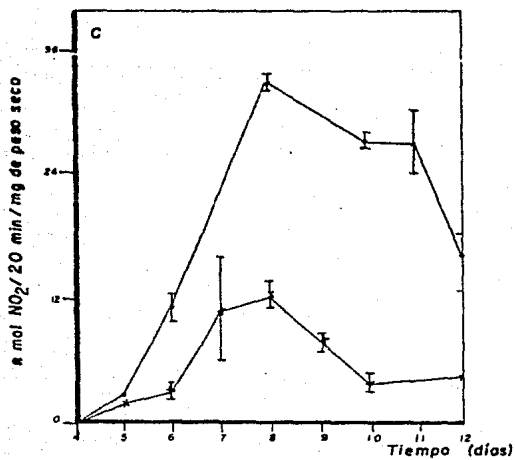
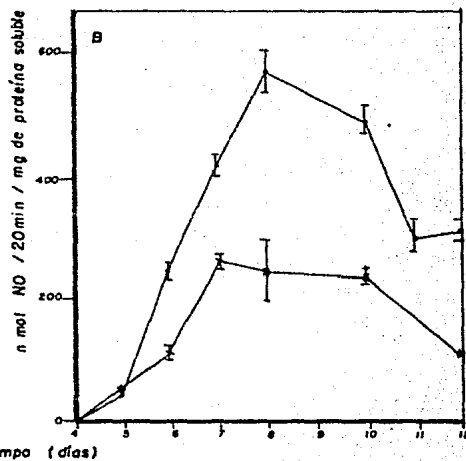
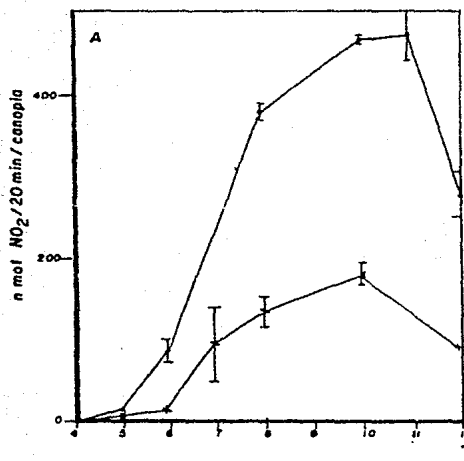


Fig. 3.10 CINETICA DE ACUMULACION DE ANR.

(—) control; (—) bajo vigor.
 A. expresada por canopia; B, por mg de proteína soluble; C, por mg de peso seco.

de la plántula (fig. 3.11.A) siendo menor la acumulación de nitratos en plántulas de bajo vigor que en las control. Resultados similares se obtienen al graficar los niveles de nitratos/mg de materia seca (fig. 3.11.B). Al parecer, se requiere de cierta madurez de la plántula para poder concentrar nitratos, ya que las plántulas control de 5 y 6 días captan la misma cantidad de nitratos/mg de materia seca.

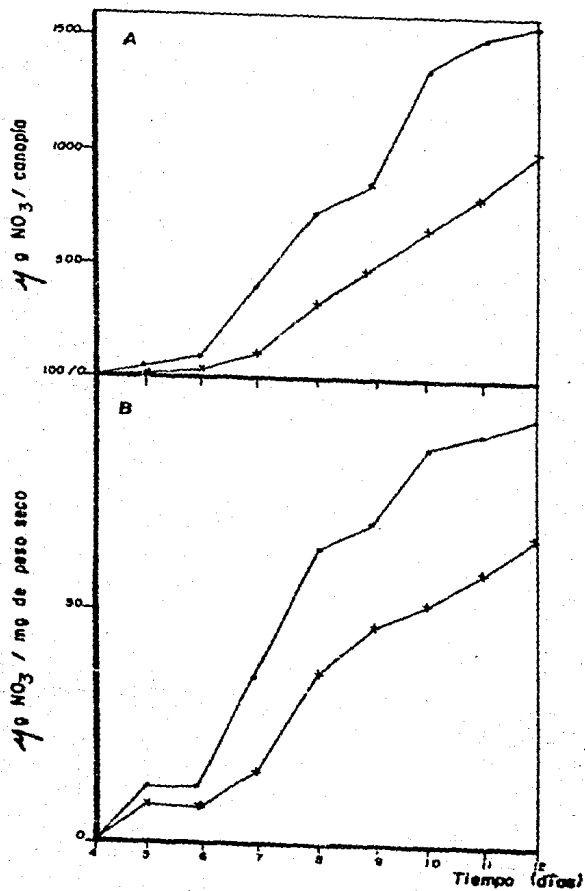


Fig. 3.11 ONTOGENIA DE ACUMULACION DE NO₃⁻. .
 A, expresada por canopia; B, por mg
 de peso seco. (—○) canopias control;
 (---×) de bajo vigor.

4) DISCUSION

Sometiendo a las semillas a temperaturas y humedades relativas altas, se ha logrado acelerar su proceso de envejecimiento. El deterioro de la semilla que conlleva el envejecimiento de la misma, implica toda una serie de cambios en su fisiología y bioquímica. Estos cambios se manifiestan durante la germinación y el crecimiento heterotrófico de la plántula y van desde una disminución en la velocidad de la germinación (1) hasta la total pérdida de la viabilidad del embrión (48). Una consecuencia del envejecimiento de las semillas es la producción de plántulas con un vigor disminuido, esto es, con una menor capacidad de crecimiento heterotrófico y establecimiento de la planta autotrófica (23).

La mayor parte de los estudios realizados en semilla deteriorada, han sido en poblaciones mixtas de semillas viables y no viables (11) y enfocando la atención a los eventos que ocurren durante la germinación (1,45). En este trabajo, se hizo un especial hincapié en la obtención de una población de semillas deterioradas que tuvieran una viabilidad y velocidad de germinación similar al control, pero que dieran lugar a plántulas con un vigor disminuido. Lo anterior se hizo con la finalidad de evitar el oscurecimiento de los resultados por la presencia de semillas no viables y poder esclarecer la participación de la movilización de las reservas en la expresión del vigor, asumiendo que los eventos que suceden en el embrión durante la germinación, se dan tanto en semillas deterioradas como en control.

Uno de los resultados en este trabajo, fue que la semilla de trigo var. Salamanca, cosecha 1984 almacenada a 100% HR a 20°C ó 30°C por dos días, manifiestan tanto una mayor velocidad de germinación,

así como una mayor capacidad de acumulación de materia seca al 7º día de iniciada la imbibición, con respecto a las no tratadas. El resultado anterior sugiere que las semillas almacenadas en las condiciones antes descritas, se invigorizan, de acuerdo con Heydecker y Hegarty (22,25). Asimismo, se encontró que las semillas manifiestan una mayor pérdida de viabilidad cuando son sembradas secas después del tratamiento de humedad (a TA por 24 h), que cuando son sembradas húmedas, recién sacadas del tratamiento de deterioro (tab. 3.1). Ambos resultados apoyan la sugerencia de Bewley y Black (11), quienes postulan que mientras la semilla mantenga cierto grado de hidratación constante, los mecanismos de reparación se encuentran activados permanentemente, reparando los daños causados por el deterioro, evitando así que se acumulen y después sean imposibles de reparar.

Por otra parte, almacenando la semilla var. Salamanca, cosecha 1984 con humedad inicial ajustada al 17%, a una humedad relativa de 85% y 42°C por 4 días, se logró obtener una población de semillas deterioradas con una viabilidad semejante a la del control, pero con una menor velocidad de germinación (tab. 3.6). Para eliminar los efectos de la menor velocidad de germinación en el crecimiento de las plántulas, se escogieron sólo aquellas semillas tratadas que mostraron igual velocidad de germinación que el control. En estas condiciones, la capacidad de crecimiento de las plántulas provenientes de semilla deteriorada fue menor que el control. Este resultado apoya la sugerencia de que los mecanismos que controlan la germinación son diferentes a los que controlan la capacidad de crecimiento de la plántula (1,48) y por consiguiente el vigor de la misma.

La condición indispensable para la germinación, es que el embrión permanezca viable. Una vez germinada la semilla, comienza el periodo

de crecimiento heterotrófico. El crecimiento y desarrollo de la plántula en esta etapa, se realiza a expensas del material de reserva almacenado en la semilla. Este es hidrolizado en el endospermo almidonoso y adecuado en el escutelo para ser transportado y asimilado por el embrión. La capacidad de la plántula para realizar y coordinar estos procesos se reflejaría en su velocidad de crecimiento. Fisiológicamente se dice que una plántula es tanto más vigorosa cuanto mayor velocidad de crecimiento heterotrófico presente. Como consecuencia, el vigor dependerá de la eficiente movilización y asimilación de las reservas almacenadas en la semilla.

Durante el periodo heterotrófico (dependiente de las reservas), la plántula desarrolla una serie de procesos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que le permitirán establecerse como un organismo independiente, es decir, se capacita para la autotrofia.

La capacitación autotrófica adiestra a la plántula para que una vez que sus reservas se hayan agotado sea capaz de continuar con su desarrollo, utilizando el CO_2 atmosférico y el nitrógeno inorgánico (Ni). La asimilación del CO_2 se realiza por medio de la fotosíntesis (fototrofia) y la del Ni por medio del proceso de reducción del nitrato (azeotrofia).

El hecho de que la capacitación autotrófica se realice en forma paralela al proceso de movilización de las reservas, sugiere la posibilidad de que ambos procesos sean interdependientes.

Por otra parte, ya que el vigor se manifiesta como una menor capacidad de crecimiento de la plántula heterotrófica, es de esperarse que el proceso de adquisición de la autotrofia sea modificado por el vigor de la plántula.

Con la finalidad de estudiar ambas propuestas, en este trabajo se determinó la eficiencia de las plántulas control y de bajo vigor para movilizar sus reservas (fig. 3.1), la capacidad de ambos sistemas para asimilar el CO_2 (fototrofia) (fig. 3.4) y el nitrógeno inorgánico (azeotrofia, fig. 3.7).

Durante el periodo comprendido entre el 4º y el 8º día, las plántulas provenientes de semillas deterioradas, presentaron una menor eficiencia en la movilización de sus reservas, esto se ve reflejado en la mayor acumulación de peso seco en las plántulas control con respecto a las de bajo vigor (fig. 3.1). Sin embargo, la velocidad de crecimiento es similar en ambos casos. Este comportamiento no se ve modificado cuando se suplementan iones inorgánicos excepto nitratos (Hg-NO_3^-) (fig. 3.2). La adición de este último a la disolución nutritiva de riego (Hg+NO_3^-) produce plántulas de menor peso seco en canopia durante este mismo lapso de tiempo (fig. 3.5.A), que las producidas en su ausencia (fig. 3.4.A). Este efecto del nitrato durante el periodo heterotrófico se observa tanto en plántulas control como de bajo vigor. Esto podría deberse a que las plántulas regadas con NO_3^- requieren de un mayor aporte de energía y por lo tanto su metabolismo oxidativo sea mayor que en las regadas $-\text{NO}_3^-$. La necesidad de un aporte extra de energía podría deberse al hecho de que en presencia de NO_3^- exógeno, las plántulas deben sintetizar ciertas proteínas que en su ausencia no se requieren, por ejemplo NR y NiR; proteínas reguladoras de la ANR; proteínas que participan en el transporte de NO_3^- a través de la raíz, etc., así como la síntesis de cloroplasto. Evidencia que apoya este último hecho, es que en presencia de NO_3^- exógeno, la fototrofia se logra más rápidamente que en su ausencia (fig. 3.5 y 3.7). En plántulas regadas con NO_3^- , se alcanza a los 6-7 días para ambos

casos, mientras que en plántulas sin nitratos, la fototrofia se logra hasta después de los 8 días para el control y los 10 días para canopias de bajo vigor.

Durante este mismo periodo de crecimiento (4° - 8° días), la cantidad de proteína heterotrófica soluble, acumulada en canopias de bajo vigor, es menor que el control. Sin embargo, a partir del 8° día, los niveles de proteína son similares. Esto sugiere que la capacidad de síntesis de proteína en ambos sistemas es muy semejante y muy probablemente el retraso en la acumulación de proteína por canopias de bajo vigor se deba a una menor movilización de la proteína de reserva. Evidencia que apoya esta sugerencia es la presentada por Bernal-Lugo (5), quien encuentra que la actividad de la proteasa producida por aleurona es menor en semillas deterioradas que en las control.

A pesar de que la capacidad de síntesis de proteínas tanto en canopias control como de bajo vigor es similar, la acumulación de proteína soluble en presencia de nitratos exógenos (fig. 3.9.B) siempre es menor para canopias de bajo vigor que para el control. Este hecho sugiere que la capacidad de asimilación de nitrógeno inorgánico en plántulas de bajo vigor es deficiente con respecto al control. Esta sugerencia está apoyada fuertemente por el hecho de que las canopias control a partir del 6° día acumulan proteína heterotrófica soluble en cantidades cada vez mayores (fig. 3.9.C), lo cual se refleja también en una mayor acumulación de peso seco en canopia ($Hg+NO_3^-$ vs $Hg-NO_3^-$ (fig. 3.2.A), mientras que las canopias de bajo vigor no se detecta un aumento ni en la acumulación de proteína (fig. 3.9.D) ni en la acumulación de peso seco en canopia ($Hg+NO_3^-$ vs $Hg-NO_3^-$, fig. 3.3.A).

La incapacidad que presentan las plántulas de bajo vigor para

asimilar el N_i parece deberse a un menor aporte de nitrógeno reducido, ya que la ANR tanto inducida por periodos cortos (24 h) (fig. 3.8) como acumulada (fig. 3.10) siempre es menor en canopias de bajo vigor con respecto al control. Esta menor ANR presentada por las canopias de bajo vigor parece deberse a la menor capacidad que presentan las plántulas de bajo vigor respecto al control, para captar (fig. 3.9) y acumular nitratos (fig. 3.11), quizás porque el tratamiento de envejecimiento acelerado haya afectado el desarrollo del sistema de transporte de nitratos o bien porque la menor velocidad de movilización de la reserva influya en el desarrollo del sistema de toma activa de nitratos.

En la literatura existe evidencia que apoya esta última sugerencia. Se sabe que el desarrollo del sistema de absorción de nitratos es afectado en algunos casos por la presencia de aminoácidos (32, 34). Además, hay sugerencias de que el sistema de toma activa no se desarrolla mientras el endospermo permanezca activamente proporcionando nitrógeno reducido (37) ó carbohidratos (38) a la plántula. Sin embargo, con los resultados de este trabajo, no nos es posible establecer la casualidad del fenómeno anteriormente citado.

Por otra parte, un hecho interesante que vale la pena discutir, es que la ANR inducida por 24 h, disminuye apreciablemente en canopias de bajo vigor a partir del 8^o día mientras que en las control lo hace sólo a partir del 11^o día (fig. 3.8.A). Este hecho podría deberse a que la NR en canopias de bajo vigor sea más sensible a la inactivación (2, 15, 20) que en canopias control, sin que los niveles de proteína soluble disminuyan apreciablemente o bien que se sintetiza en menor cantidad.

Por último se encontró que la ANR por mg de proteína soluble

(Fig. 3.8.B) y 3.10.B) o por mg de peso seco (fig. 3.8.B y 3.10.C) disminuyen a partir del 8º día con la edad de la plántula, lo cual revela que una vez alcanzada la fototrofia la NR se hace más eficiente en aportar N reducido para la síntesis de proteínas así como para acumular peso seco a medida que la plántula se hace más autotrófica.

Los resultados discutidos apoyan la hipótesis planteada en este trabajo: Las plántulas de bajo vigor presentan menor capacidad de crecimiento que las control porque la movilización de reservas y la capacitación autotrófica se encuentran dañadas. Además, también establecen la existencia de una correlación entre la expresión de los mecanismos bioquímicos que forman parte de la capacitación autotrófica y la eficiencia con la cual se realiza la movilización de reservas, ya que las plántulas con el mismo grado de desarrollo pero diferente capacidad para movilizar las reservas (mismo peso seco y contenido de proteína figs. 3.1 y 3.6) presentan diferente grado de autotrofia cuando ésta es medida como capacidad de la plántula para inducir nitrato reductasa ó acumulación de proteína.

5) CONCLUSIONES.

A continuación se enlistan las conclusiones más relevantes de este trabajo:

- 1.- La semilla var. Salamanca cosecha 1984, almacenada a 100% HR y 20° y 30°C por dos días, se invigorizan con respecto a las no tratadas.
- 2.- La semilla var. Salamanca cosecha 1984 con humedad inicial ajustada al 17% y almacenada a 85% HR y 42°C por 4 días se deteriora con respecto a las no tratadas, produciendo semillas con viabilidad semejante al control pero que dan origen a plántulas de bajo vigor.
- 3.- El vigor se manifiesta como una menor capacidad de crecimiento de la plántula durante el periodo heterotrófico, la cual a su vez está determinada por la eficiencia en la movilización de la reserva.
- 4.- Tanto las canopias de bajo vigor como las control, alcanzan la fototrofia, aunque las primeras no logran integrar durante el tiempo estudiado, el proceso de asimilación del nitrógeno al de la fotosíntesis.
- 5.- Las plántulas de bajo vigor, acumulan una menor cantidad de proteína soluble en presencia de NO_3^- , a pesar de que ambos sistemas presentan una capacidad de síntesis de proteínas similar.
- 6.- La capacidad para inducir y acumular ANR así como la capacidad para captar nitratos y acumularlos, varía con la edad de la plántula y ambos son menores para plántulas de bajo vigor.
- 7.- Existe una correlación entre la capacitación autotrófica de las plántulas y la eficiente movilización de las reservas almacenadas en el endospermo.

6) PERSPECTIVAS.

Para continuar con esta línea de investigación, quedan abiertas varias posibilidades:

1.- Determinar si el sistema transportador y de toma activa de nitratos se dañó a consecuencia del tratamiento de envejecimiento acelerado y si este daño es particular o general para cualquier tratamiento dado.

2.- Se ha propuesto que el NO_3^- en las plantas está distribuido en dos compartimientos (3): la poza citoplásmica metabólica, de pequeño tamaño y recambio rápido y; la poza vacuolar de almacenamiento. Se piensa que el NO_3^- de la poza metabólica es el que induce la actividad de la NR "in vivo". De acuerdo con esto, y a pesar de que la menor capacidad de toma y de acumulación de NO_3^- presentada por las plántulas de bajo vigor, la poza metabólica de ambos podría ser similar y lo que estuviera afectando la asimilación del NO_3^- fuera una afinidad diferente de la enzima por su sustrato a consecuencia del envejecimiento o bien que el mecanismo de inducción de la enzima estuviese afectado.

3.- Por otra parte, ya que en este trabajo sólo se estudió la azeotrofia asumiendo, por los resultados de acumulación de peso seco de las plántulas regadas con Hg-NO_3^- , que la fototrofia se alcanza, se propone estudiar la actividad de alguna de las enzimas marcadoras del desarrollo de cloroplasto suplementado el crecimiento de las plántulas con y sin NO_3^- , tanto en plántulas control como de bajo vigor.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abdul-Baki, A.A. y Anderson, J.D. (1972). Physiological and Biochemical deterioration of seeds en, Seed Biology, Cap. 4, 283-315, I. Kozlowski, T.T. (Ed) Acad. Press.
- 2.- Aryan, A.P., Bart, R.G. y Wallace, W. (1983). Reversible inactivation of nitrate reductase by NADH and the occurrence of partially inactive enzyme in the wheat leaf. Plant Physiology, 71, 582-587.
- 3.- Baer, G.R. y Collet, G.F. (1981). In vivo determination of parameters of nitrate utilization in wheat (*triticum aestivum* L.) seedling grown with low concentration of nitrate in the nutrient solution. Plant Physiology 68, 1237-11243.
- 4.- Bernal-Lugo, I. (1984). Aspectos bioquímicos de la germinación y el deterioro. Memorias del Curso de Conservación de Granos y Semillas. PUAL.
- 5.- Bernal-Lugo, I., Rodríguez, M., y Parra, C. (1986). Caracterización funcional de la capa de aleurona en semillas de bajo vigor. XVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. 2-7 nov. Jalapa, Ver.
- 6.- Bewley, J.D. y Black, M. (1978). The structure of seeds and their food reserves, en Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination. V. 1, cap. 2, 7-39. Development, Germination and Growth. Springer-Verlag (Ed).
- 7.- Bewley, J.D. y Black, M. (1978). Imbibition, germination and growth, en Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination. V. 1, cap. 4, 106-131. Development, Germination and Growth. Springer-Verlag (Ed).
- 8.- Bewley, J.D. y Black, M. (1978). Biochemistry of germination and

- growth, en *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*. V. 1, cap. 5, 132-178. Development, Germination and Growth. Springer-Verlag (Ed.).
- 9.- Bewley, J.D. y Black, M. (1978). Mobilization of reserves, en *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*. V. 1, cap. 6, 177-244. Development, Germination and Growth. Springer-Verlag (Ed.).
- 10.- Bewley, J.D. y Black, M. (1978). Control Processes in the mobilization of reserves, en *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*. V. 1, cap. 7, 245-282. Springer-Verlag (Ed.).
- 11.- Bewley, J.D. y Black, M. (1982). Viability and longevity, en *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*. V. 2, cap. 1, 1-59. Viability, Dormancy and Environmental Control. Springer-Verlag (Ed.).
- 12.- Campbell, W.H. (1985). The biochemistry of higher plant nitrate reductase, en *Nitrogen Fixation and CO₂ metabolism*. Ludden, P. y Bumis, L. (Ed). Elsevier Publishing Co.
- 13.- Cuming, A.C. y Lane, B.G. (1979). Protein synthesis in imbibing wheat embryos. *Eur. J. Biochem.* 99, 217-224.
- 14.- Delfens, E. y Brulfert, J. (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase capacity and establishment of autotrophy in maize seedlings. *Physiologie Végétale*, 21, 827-834.
- 15.- Duke, S.H. y Duke, S.O. (1984). Light control of extractable nitrate reductase activity in higher plants. *Physiol. Plant.* 62, 485-493.
- 16.- Echevarría, C., Mauriño, S.G. y Maldonado, J.M. (1984).

- Reversible inactivation of maize leaf nitrate reductase. *Phytochemistry* 23, 2155-2158.
- 17.- Esquivel, F.R.M. (1984) Estudios sobre el endurecimiento de frijol almacenado. Tesis Profesional. UNAM Facultad de Ciencias. México.
 - 18.- Guerrero, M.G., Vega, J.M. y Losada, M. (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32, 169.
 - 19.- Gupta, A., Sopory, S.K. y Guha-Mukherjee, S. (1979). The presence of a noninducible phase for nitrate reductase during early phase of germination in barley embryos. *Z. Pflanzenphysiol.*, 92, 249-254.
 - 20.- Hamano, T., Oji, Y., Okamoto, S., Mitsuhashi, Y. y Matsuki, Y. (1984). Purification and characterization of thiol proteinase as a nitrate reductase-inactivating factor from leaves of *Hordeum distichum* L. *Plant and Cell Physiol*, 25, 419-427.
 - 21.- Harris, P. y Whittington, W.J. (1983). The relationship between nitrate reductase and productivity in agrostis species. *New Phytol.*, 95, 3-8.
 - 22.- Hegarty, T.W. (1978). The physiology of seed hydration and dehydration, and the relation between water stress and the control of germination: a review. *Plant, Cell and Environment*, 1, 101-119.
 - 23.- Heydecker, W. (1972). Vigour, en *Viability of Seeds*. Cap. 8, 209-251. Roberts, E.H. (Ed). Syracuse University Press.
 - 24.- Hoagland, D.R. y Arnon, D.I. (1950). The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Care*. 347.
 - 25.- Jofre, G.A.E. (1983). Regulación de la Síntesis de enzimas hidro-

- líticas inducidas por ácido giberélico en capas de aleurona de trigo var. Potam S-70. Tesis de Maestría (Bioquímica). Facultad de Química, UNAM.
- 26.- Johnson, C.B., Whittington, W.J. y Blackwood, G.C. (1976). Nitrate reductase as a possible predictive test of crop yield. *Nature* 262, 133-134.
- 27.- Kuo, T., Warner, R.L. y Kleinhofs, A. (1982). In vitro stability of nitrate reductase from barley leaves. *Phytochemistry* 21, 531-533.
- 28.- Kuznetsov, V. V. (1984). Effect of ammonium on hormonal and substrate induction of nitrate reductase in isolated corn cockle embryos. Traducido de *Fiziologiya Rastenii*, 31, 517-524.
- 29.- Kuznetsov, V.V. et al. (1984). Effects of pH of the medium on the induction of nitrate reductase in isolated cucumber cotyledons and corn cockle embryos: a comparative study. Traducido de *Fiziologiya Rastenii*, 31, 666-672.
- 30.- Lillo, C. (1984) Diurnal variations of nitrate reductase, glutamine synthetase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. *Physiol. Plant.*, 61, 214-218.
- 31.- Lillo, C. (1984). Circadian rhythmicity of nitrate reductase activity in barley leaves. *Physiol. Plant.*, 61, 219-223.
- 32.- Marion, P.A. et al. (1984). Regulation of nitrate reductase in protoplast derived cells: influence of exogenously supplied nitrate, ammonium and amino acids. *Plant Sci. Let.*, 34, 61-72.
- 33.- Minotti, P.L., et al. (1969). Nitrate uptake by wheat as influenced by ammonium and other cations. *Crop Science* 9, 9-13.
- 34.- Mishra, S.N. y Srivastava, H.S. (1983) Increase in nitrate reduc-

- tase activity, organic nitrogen and protein content of maize leaves supplied with nitrate or ammonium. *Z. Pflanzenphysiol.* 113, 91-93.
- 35.- Mokronosov, A.T. (1983). Integration of the functions of growth and photosynthesis. Traducido de *Fiziologiya Rastenii*, 30, 868-880.
- 36.- Moreno, M.E. (1984). Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología, UNAM.
- 37.- Oaks, A. (1983). Regulation of nitrogen metabolism during seedling growth en *Mobilization of Reserves in Germination*. Nozzdillo, C., Lea, P.J. y Lewis, F.A. (Ed). Plenum Press.
- 38.- Fate, J.S. (1980). Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31, 313-340.
- 39.- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. *Analytical Bioche.* 83, 346-356.
- 40.- Pollock, B.M. y Roos, E.E. (1972). Seed and seedling vigor, en *Viability of seeds*. Cap. 6. 313-387. Roberts, E.H. (Ed.) Syr. Univ. Press.
- 41.- Ramao, C.S. et al (1981). Origin of reductant for reduction of nitrate and nitrite in rice and wheat leaves in vivo. *New Phytologist*, 87, 817-825.
- 42.- Reed, A.J. y Hageman, R.H. (1980). Relationship between nitrate uptake, flux and reduction, and the accumulation of reduced nitrogen in maize (*zea mays* L.). II Effect of nutrient nitrate concentration. *Plant Physiol.*, 66, 1184-1189.
- 43.- Roberts, E.H. (1972). Storage, Environment and the control of viability, en *Viability of Seeds*. cap. 2, 12-57, Roberts, E.H.

(Ed). Syracuse University Press.

- 44.- Roberts, E.H. (1972). Loss of viability and crop yields, en Viability of Seeds. cap. 10, 307-391. Roberts, E.H. (Ed.). Syracuse Univ. Press.
- 45.- Smith, C.A.D. y Bray, C.M. (1984). Polyadenylated RNA levels and macromolecular synthesis during loss of seed vigour. Plant Science Letters 34, 335-343.
- 46.- Snell, F.D. y Snell, C.T. (1949). Colorimetric methods of analysis. V.II D. Van Nostrand Co. New York.
- 47.- Sherrard, J.H. et al (1979). In vitro stability of nitrate reductase from wheat leaves. Plant Physiol., 64, 439-444.
- 48.- Tiburcio, T.L. (1986). Caracterización bioquímica de la capa de aleurona de semillas de bajo vigor. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- 49.- Vela, B.M. Tesis de Maestría (Bioquímica) Facultad de Química, UNAM (en prensa).
- 50.- Vela, B.M. y Bernal-Lugo, I. (1986) Nitrate reductase activity as a marker of autotrophy in wheat seedlings. Plant Physiology 80 (supl) 113.
- 51.- Voronova, L.P. et al. (1983). Nitrate reductase dynamics and nitrogen metabolism in the acumulative cycle of a corn cell suspension culture. Traducido de Fiziologiya Rastenii, 30, 138-145 (1983).
- 52.- Winston, P.W. y Bates, D.H. (1960). Saturated solutions for the control of humidity. Biological Research 4, 232-237.