

187
291

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



**COMPARACION DE LA ABSORCION DE NITRATOS POR RAICES
DE TRIGO PROVENIENTES DE SEMILLAS CONTROL
Y DETERIORADAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

RUBEN SAN MIGUEL CHAVEZ

México, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1991



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.

INDICE. -

	Págs.
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	
1.1 LA SEMILLA	1
1.2 VIGOR Y VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS	2
1.2.1 Pruebas para medir el vigor	4
1.3 DETERIORO EN LAS SEMILLAS	
1.3.1 Factores que influyen en el deterioro de semillas de especies cultivadas por el hombre	5
1.3.2 Efecto del deterioro en la semilla	6
1.3.3 Uso de marcadores fisiológicos y bioquímicos para determinar el vigor de las semillas	7
1.3.4 Medidas preventivas para la conservación del vigor en las semillas	
1.4 IMPORTANCIA DEL NITROGENO PARA LAS PLANTAS	8
1.4.1 El nitrógeno(N) en la naturaleza	9
1.4.2 Fijación del nitrógeno	10
1.4.3 Nitrificación	
1.4.4 Desnitrificación	11
1.4.5 Utilización del nitrógeno por las plantas	
1.4.6 Metabolismo del nitrato en las plantas	12
1.5 ABSORCION DE NITRATOS POR LAS CELULAS DE LAS RAICES	13

1.5.1	Técnicas y sistemas empleados en el estudio de la absorción de nitratos	14
1.5.2	Energética de la absorción de nitratos y mecanismos propuestos	15
1.5.3	Regulación de la absorción de nitratos	17
1.5.4	Cinética de la absorción de nitratos	18
1.5.4.1	Efecto de la concentración externa de nitratos	
1.5.4.2	Efecto del pH	19
1.5.4.3	Inhibidores de la absorción de nitratos	20
1.5.4.4	Factores que contribuyen a incrementar la toma de nitratos	
1.6	SITUACION DE LA PRODUCCION DE TRIGO EN MEXICO	21
	OBJETIVOS E HIPOTESIS	24
	METODOLOGIA	25
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	25
3.2	DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DE LA SEMILLA	
3.3	DETERIORO DE LA SEMILLA	26
3.3.1	Ajuste del contenido de humedad de la semilla	
3.3.2	Preparación de la cámara de deterioro	27
3.3.3	Término del proceso de deterioro	
3.4	EVALUACION DEL VIGOR Y VIABILIDAD DE LOS LOTES CONTROL Y DETERIORADO	

3.4.1 Cinética de crecimiento	
3.4.2 Velocidad de germinación	28
3.5 DETERMINACION DE LA ABSORCION DE NITRATOS A UN pH CONSTANTE DE 6	29
3.5.1 Determinación de la absorción de nitratos en soluciones con otros pH	
3.6 DETERMINACION DE NITRATOS	30
3.6.1 Método con ác. perclórico	
3.6.2 Método con brucina	
3.6.3 Método con ác. salicílico	31
3.7 DETERMINACION DEL NITRATO ENDOGENO DE LAS RAICES	32
3.8 METODOS ESTADISTICOS	
3.8.1 C.V.G.	
3.8.2 Velocidad de crecimiento	33
RESULTADOS	34
4.1 OBTENCION DEL LOTE DETERIORADO DE SEMILLAS	
4.2 VIGOR Y VIABILIDAD DE LOS LOTES DE SEMILLA CONTROL Y DETERIORADO	
4.3 DETERMINACION DE LA ABSORCION DE NITRATOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES A pH 6.0	36
4.3.1 Determinación de la absorción de nitratos de los lotes experimentales a pH 4.5 y 7.5	38
4.3.2 Determinación de la absorción de nitratos de los lotes experimentales con los métodos de brucina y ác. salicílico	42
DISCUSION	48
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFIA	58

I
N
T
R
O
D
U
C
C
I
O
N

INTRODUCCION

No es fácil ubicar históricamente el momento preciso en que el hombre comenzó a utilizar en su dieta a los granos^m, pero cuando esto sucedió empezó a depender de ellos al grado de que actualmente, los utiliza como principal componente de su alimentación (1).

En términos generales se considera que la dieta del hombre consiste en un 70 % de productos de origen vegetal (siendo estos principalmente granos) y el resto de origen animal (1). Uno de los vegetales que conforman este vasto conjunto, es el trigo.

El trigo, que corresponde al género *Triticum* sp. se encuentra representado por varias especies de interés comercial, como lo son *Triticum aestivum* ó *Triticum vulgare*, *Triticum turpidum*, *Triticum spelta*, etc(2). Se tiene conocimiento de que este valioso cereal se cultivó desde hace 5000 años en China, y que es de origen europeo(2).

A nivel mundial, el trigo es uno de los granos y semillas^m que más se producen y comercializan, siendo imprescindible un aumento cada año en su producción, por lo que las investigaciones encaminadas en este sentido están enfocadas a temas que van desde el mejoramiento genético en el laboratorio, la producción en el campo, hasta su correcto manejo en el almacenamiento y distribución.

ANTECEDENTES

1.1 LA SEMILLA

La semilla "es el óvulo fecundado, transformado y maduro de las plantas Fanerógamas (las que producen flor); asimismo, es la parte de los vegetales que tiene como función reproducir y perpetuar la especie" (2,3).

*Semilla.- Nombre que los agrónomos dan a toda aquella parte de una planta que sirve para ser sembrada.

*Grano.- Toda aquella semilla destinada para el consumo.

Su forma y color externos, así como su estructura interna varían según la especie de que se trate (Fig.1). Una vez que una semilla llega a su madurez, se observa que las células vivas del embrión entran en "latencia", lo cual significa que las funciones de respiración y nutrición disminuyen a un grado mínimo (2,5).

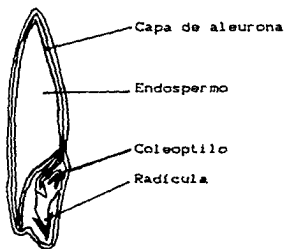


Figura 1.- Morfología interna de una semilla de trigo (tomada de (4)).

Esta maduración va acompañada por lo general por una pérdida de agua en sus tejidos. Al concluir el proceso de maduración, la semilla inicia una etapa de vida latente; la longevidad de la semilla, esto es, el tiempo que permanece en éste estado y con potencial germinativo, es muy variable dependiendo de circunstancias tales como la especie de planta de que se trate y el tipo de reserva contenida en la semilla(2,5).

Es en este lapso de tiempo en el que las semillas pueden ser susceptibles de verse afectadas en su "vigor" al ser sometidas a condiciones extremas como se verá más adelante.

1.2 VIGOR Y VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS

En el medio agronómico suele escucharse con regularidad la frase "esta semilla tiene alta VIABILIDAD" se refiere a si una

semilla germinable) o no germina(no es viable)) y un excelente VIGOR"; con lo que se trata de expresar que un lote de semillas tiene muchas posibilidades de crecer y desarrollarse óptimamente en el campo.

Sin embargo, la palabra vigor no solamente se utiliza en este contexto. En un principio, vigor significó "la habilidad que capacita a una plántula para crecer rápidamente y bien"(8); más tarde Isely(7) en 1957, sugirió dos ideas respecto al vigor que fueron: 1) rapidez de crecimiento y 2) la no existencia de susceptibilidad a condiciones desfavorables de crecimiento; llegando a la conclusión de que el vigor "es la suma total de todos los atributos de una semilla que favorecen su correcto establecimiento en el campo aún cuando se presentaran condiciones ambientales desfavorables". Ader(8) menciona que "el vigor es el porcentaje de semillas capaces de producir plántulas normales, aunque las condiciones no sean las óptimas". Debe notarse que a partir de la primera idea de lo que es el vigor de una semilla, las definiciones van abarcando un mayor número de aspectos, que no sólo involucran a la semilla sino también otros relacionados con el ambiente en donde finalmente tendrá que germinar y establecerse.

Continuando con este análisis, se encuentra que Neeb(9) en 1970 define el vigor de una semilla como "el total de propiedades que contribuyen a la defensa contra peligros bióticos y abióticos durante la germinación". Germ(10), define vigor como "la habilidad de las semillas a producir plántulas capaces de incrementar su talla y volumen mientras dependan de sus propias reservas".

Como era de esperarse, resulta que la palabra vigor abarca muchos aspectos, desde los concernientes a la estructura interna de la semilla, hasta los ambientales a los que se enfrentará una vez que sea sembrada; pese a ello, creo que una exacta definición de lo que es vigor es muy difícil de encontrar, pues en la mayoría de las ocasiones, el concepto de vigor de una semilla variará dependiendo del profesionista que lo defina, ya que mientras un bioquímico le dará más peso a la definición que abarque procesos metabólicos y fisiológicos, un agrónomo seguramente pondrá mayor énfasis en las condiciones del ambiente.

1.2.1 Pruebas para medir el vigor

Existe toda una serie de pruebas que se diseñaron con la finalidad de determinar cuál es el nivel de vigor de un lote de semillas, y aunque algunas son muy antiguas, dada su facilidad y rapidez se continúan utilizando en muchos laboratorios del mundo (8.11.12). Las pruebas son las siguientes :

1) Prueba del ladrillo molido.- Verifica la capacidad de emergencia que tiene una semilla al ser sembrada bajo una capa de ladrillo molido ó arena con un determinado espesor.

2) Prueba fría.- Determina el efecto de las bajas temperaturas sobre el desarrollo de las plántulas.

3) Prueba de agotamiento.- Esta mide el potencial de crecimiento de las plántulas antes de que comiencen a fotosintetizar.

4) Prueba de conductividad eléctrica.- Determina la habilidad de las membranas celulares para prevenir la fuga de electrolitos.

5) Prueba del tetrazolio para la viabilidad, en la cuál las células vivas (aquellas que producen actividad de deshidrogenasa), se tornan rojas.

6) La prueba de germinación.- Consiste en sembrar semillas en toallas de papel para germinación, enrollándolas posteriormente e incubándolas en una cámara húmeda a una determinada temperatura, para después contar el número de semillas germinadas y expresar el resultado final en porciento de semillas germinadas.

Esta última prueba es la que más se utiliza en los laboratorios de verificación de calidad de semillas, pues bajo rigurosos criterios dictados por asociaciones como la "International Seed Testing Association ", puede dar una estimación real del vigor que presenta un lote de semillas.

1.3 DETERIORO EN LAS SEMILLAS

Como se citó en las primeras líneas de esta tesis, resulta apremiante la obtención de cosechas de trigo cada vez mayores para abastecer el mercado nacional y mundial, pero el esfuerzo que se realice en el campo para llevar a cabo ésto, muchas veces puede

verse mermado si en el almacén donde se guardan los granos que serán vendidos como alimento o las semillas para ciclos de siembra posteriores, carecen de las condiciones necesarias para mantener el vigor de las semillas, propiciando su deterioro (11).

La palabra deterioro, significa simple y llanamente estropear ó arruinar, ahora bien, si se aplica a las semillas entonces "el deterioro de una semilla implica un cambio degenerativo irreversible en la calidad de ésta, después de haber tenido su máximo nivel de vigor"(12). Para comprender la magnitud del problema se analizarán a continuación los factores principales que influyen en el deterioro de las semillas.

1.3.1 Factores que influyen en el deterioro de semillas de especies cultivadas por el hombre

Quando se observa detenidamente la historia de una semilla agrícola, desde su surgimiento en la planta madre hasta su salida del almacén donde estuvo aguardando el momento de emprender su regreso al campo para ser sembrada, se ve que son muchos los factores responsables del deterioro de ésta. Para una mejor comprensión de ellos, se describirán abarcando las etapas de : Precosecha, cosecha y post-cosecha.

Fenómenos que contribuyen al deterioro en la semilla durante la pre-cosecha :

Las plantas productoras de semillas una vez que han alcanzado su madurez y cuando todavía no son fecundadas, pudieran enfrentarse a diversos factores como son : Una deficiencia mineral, la presencia de un elemento tóxico, el ataque por una plaga y/o enfermedad ó a factores climáticos adversos como lluvias torrenciales, rayos ó granizo afectando a las plantas productoras y ocasionando finalmente el deterioro de las semillas al inicio de su formación(13).

Fenómenos que contribuyen al deterioro en la semilla durante la cosecha :

Al llegar el momento de levantar una cosecha, debe existir la seguridad de que la mayoría de las semillas han llegado a su estado de madurez , entendiendo como semilla madura aquella que ha concluido su proceso de llenado y de secado,y está lista para su

colecta, pues si la semilla no ha experimentado la suficiente pérdida de agua, al momento de utilizar la máquina cosechadora puede resultar dañada; también se ha reportado que el guardar una semilla inmadura provoca una disminución de su viabilidad después del almacenamiento, aún cuando las condiciones del almacén hayan sido las más adecuadas (14).

Fenómenos que contribuyen al deterioro en la semilla durante la post-cosecha :

Finalmente se tiene que las condiciones de manejo de la cosecha previas al almacenamiento, deben llevarse a cabo de acuerdo al estado en que se encuentren las semillas recién llegadas del campo de cultivo, para lo cual el éxito de este manejo dependerá fundamentalmente de las pruebas de calidad (vigor y viabilidad) (11,12,14). Una vez que las semillas son depositadas en el almacén, éste debe mantenerse a una temperatura y humedad adecuadas al tipo de semillas que se trate, el destino que se les dará y la cantidad de las mismas, entre otras.

1.3.2 Efecto del deterioro en la semilla

Cuando una semilla tiene contacto con condiciones adversas en cualquiera de las etapas antes mencionadas, ésta comienza a sufrir el deterioro que, en caso de ser muy severo, da por consecuencia la pérdida de viabilidad de la semilla (8). Ahora bien, el hecho de que una semilla finalmente muera a consecuencia de un deterioro drástico, no significa que la muerte en sí sea un efecto inmediato; sino más bien la consecuencia de una serie de cambios que se dan en la semilla y que en su etapa final dan como resultado la muerte (12).

Los cambios bioquímicos y fisiológicos en una semilla deteriorada según Heydecker (6) son :

- Degradación de las membranas celulares y una subsecuente pérdida del control de la permeabilidad.
- Deterioro del sistema energético y de los mecanismos biosintéticos.
- Una reducción de la respiración y biosíntesis.
- Una disminución en el vigor y viabilidad de las semillas.

- Una reducción en el potencial de almacenamiento.
- Retardo en el crecimiento y desarrollo de la planta autotrófica.
- Menor uniformidad en el crecimiento y desarrollo de las plantas en la población.
- Incremento en la susceptibilidad a condiciones ambientales agobiantes.
- Incremento en el porcentaje de plantas anormales.
- Pérdida de la viabilidad.

1.3.3 Uso de marcadores fisiológicos y bioquímicos para determinar el vigor de las semillas

Dentro de los cambios que se van dando con el deterioro de una semilla, se ven involucrados una serie de componentes y procesos tanto fisiológicos como bioquímicos. Por ejemplo al sufrir una alteración alguna enzima, esto da por resultado la modificación de algún sistema de la semilla que se manifiesta cuando ésta germina(8,12).

En vista de que los mecanismos enzimáticos son relativamente fáciles y rápidos de poner a prueba en el laboratorio, para dar una evaluación del vigor de un lote de semillas, se ha propuesto una serie de marcadores bioquímicos y fisiológicos para verificarlo. Estos marcadores no son más que ciertas enzimas u otros elementos que intervienen en algún proceso vital durante los primeros estadios de la germinación ó en el establecimiento de la planta como tal. Dentro de estos marcadores se pueden mencionar a las actividades de las enzimas deshidrogenasas(15) y la descarboxilasa del ácido glutámico(16) que se han encontrado muy correlacionadas con la viabilidad de una semilla(a mayor deterioro, menor actividad de estas enzimas); también se tiene como proceso marcador a la respiración(15) ya que cuando a una semilla deteriorada se le mide el consumo de oxígeno, éste resulta bajo.

1.3.4 Medidas preventivas para evitar el deterioro de las semillas

Analizando los puntos antes mencionados se observa que son muchos los factores causales que contribuyen en mayor o menor grado al deterioro de un lote de semillas; para tratar de minimizar su efecto deben tenerse en cuenta una serie de recomendaciones, entre las que se encuentran las siguientes :

a) Cuando se decida sembrar alguna variedad de semillas de cualquier tipo de cultivo, ésta debe poseer una serie de características genéticas las cuales le permitan interactuar favorablemente con el ambiente donde vaya a desarrollarse (8).

b) Una vez sembrada, la aplicación de químicos (fertilizantes y plaguicidas) debe realizarse bajo la supervisión de personal capacitado, para evitar una contaminación excesiva de los suelos, así como una afectación de las plantas por la carencia ó exceso de algún nutriente(8).

c) Debe cosecharse en el momento oportuno y cuidando que el contenido de humedad sea el más bajo posible(en un rango de 14-18% de contenido de humedad)(13,14).

d) Durante el manejo previo al almacenamiento, debe aplicarse tecnología capaz de no provocar daño alguno durante el transporte, limpieza, secado, selección de semillas y la aplicación de fungicidas.

e) Por último, las condiciones que tienen mayor influencia en el deterioro durante el almacenamiento y que por lo tanto deben ser las más vigiladas son :

- La humedad relativa.- Los silos deben tener la humedad relativa más baja posible. Por ejemplo, en el caso de un lote de trigo con un contenido de humedad que se encuentre entre 13 y 14 %, es recomendable almacenarlo en un silo con menos del 85% de humedad relativa(1,13).

- La temperatura.- Esta debe ser alrededor de 4°C, para disminuir la respiración de los embriones así como también el desarrollo de los hongos de almacén (1,14).

1.4 IMPORTANCIA DEL NITROGENO PARA LAS PLANTAS

Como se mencionó anteriormente, diversos mecanismos y procesos fisiológicos se ven afectados de modo significativo en las plantas

provenientes de semillas que por una u otra causa fueron afectadas negativamente en su vigor. Al respecto, uno de los aspectos que se ha desarrollado en el laboratorio donde se elaboró el presente trabajo, es el de conocer el efecto del proceso de deterioro de las semillas sobre el metabolismo de los nitratos de las plantas que se van a originar de esas semillas. En un estudio llevado a cabo por Padilla(17) en 1985, se reporta que los niveles de acumulación de nitratos en las plántulas de semillas deterioradas de trigo, disminuyen en comparación con las plántulas de semillas control, lo cual sugiere que, necesariamente alguna de las etapas de asimilación de este compuesto esta siendo afectada por el deterioro. Una de esas etapas que puede estar contribuyendo a la deficiente acumulación de nitratos, podría ser un defecto en la toma ó absorción de los mismos a nivel de la membrana plasmática.

1.4.1 El nitrógeno (N) en la naturaleza

El nitrógeno es el elemento que se encuentra en mayor abundancia dentro de la atmósfera terrestre ya que ocupa cerca del 80% de la totalidad de los gases que en ella se encuentran, siguiéndole el oxígeno con un 19%, el hidrógeno y otros elementos raros(18). Dada la abundancia de este elemento en la atmósfera (cerca de 3.86×10^{18} kg)(19), se considera a ésta como el segundo reservorio importante de nitrógeno después de los sedimentos y rocas ígneas(que contienen 1.84×10^{20} kg de nitrógeno) y del cuál las plantas no pueden disponer(19).

El nitrógeno se encuentra en muchas moléculas importantes para los seres vivos como lo son los aminoácidos, purinas, pirimidinas, porfirinas, clorofilas, etc (20). Sin embargo, resulta que la mayor parte de los seres vivos no pueden disponer directamente del nitrógeno atmosférico para sintetizar dichas moléculas, por lo que requieren de varias reacciones bioquímicas, que permitan la formación de los compuestos nitrogenados asimilables para los organismos. Entre todos los seres vivos existentes, las plantas tienen como función la de convertir a los compuestos nitrogenados inorgánicos a formas orgánicas asimilables a los animales rumiantes y éstos a los no rumiantes. Esta capacidad vegetal de convertir nitrógeno inorgánico a nitrógeno orgánico juega un papel

imprescindible en el ciclo de este elemento(Fig.2).

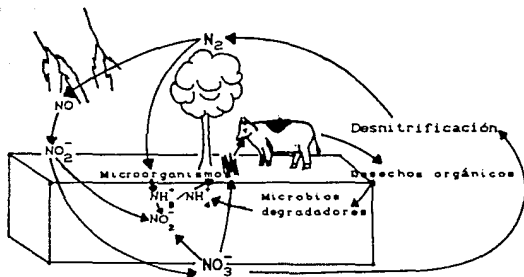


Figura 2.- Ciclo del Nitrógeno. Esquema simplificado del original(18).

1.4.2 Fijación del nitrógeno

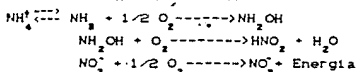
La fijación del nitrógeno a partir del aire de la atmósfera, consiste en la formación de compuestos inorgánicos nitrogenados que son puestos a disposición de seres vivos capaces de aprovecharlos, esta fijación puede llevarse a cabo de dos distintas maneras : la primera es cuando se dan eventos de ionización en la atmósfera como pueden ser descargas eléctricas ó radiaciones cósmicas, que provocan la formación de compuestos nitrogenados(muchos de ellos son óxidos), los cuales a su vez son precipitados al suelo con la lluvia(21,22). La otra forma, y la más importante, la llevan a cabo bacterias de vida libre como son las del género *Azotobacter*, algas verde-azules como las de los ordenes Nostocales y Stigonematales así como también bacterias del género *Rhizobium* sp que se encuentran asociados a algunas plantas (principalmente leguminosas)(21,22,23,24).

1.4.3. Nitrificación

Como resultado del proceso de nitrificación, muchos de los compuestos nitrogenados inorgánicos disponibles en el suelo se encuentran en forma de nitratos(NO_3^-), siendo la fuente principal de nitrógeno para las plantas(21,22). La formación de estos nitratos, se lleva a cabo mediante los siguientes sistemas :

1) El amoniaco(NH_3) presente en el suelo como resultado de la fijación de nitrógeno por microorganismos ó por la descomposición de otros organismos muertos, se oxida por medio de bacterias del grupo Nitroso(p.e. *Nitrosomas*) formandose los nitritos(NO_2^-). A su vez los nitritos se convierten en nitratos gracias a bacterias de los géneros *Nitrobacter* y *Nitrocyclus* (21).

Las siguientes ecuaciones muestran las reacciones que se llevan a cabo en este sistema. -



2) El amonio(NH_4^+) que se encuentra en equilibrio parcial con el amoniaco gaseoso, también lo oxidan bacterias del grupo Nitroso para formar nitritos(22). Los demás pasos para llegar a los nitratos son los mismos que en la forma anterior.

1.4.4 Desnitrificación

El nitrógeno de los nitratos presentes en el suelo puede llegar a ser incorporado a la atmósfera nuevamente en forma de nitrógeno molecular ó óxido nitroso a consecuencia de la acción de bacterias anaeróbicas de los géneros *Achromobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Alcaligenes* sp., *Kingella* sp., y *Moraxella* sp. (24)

1.4.5 Utilización del nitrógeno por las plantas

Las plantas, como se mencionó con anterioridad, juegan un papel muy importante en el ciclo del nitrógeno, ya que representan el enlace entre la parte inorgánica con la orgánica del mismo.

Estos seres autotróficos, pueden utilizar como fuentes nitrogenadas al amoniaco, amonio, nitritos ó nitratos. De todos

ellos, los que son comúnmente empleados por la mayor parte de las plantas superiores son el amonio y el nitrato. Al respecto se han realizado pruebas comparativas con varias especies para determinar cuál de las dos formas nitrogenadas es mejor y que produce una mayor productividad en las plantas. Los resultados han mostrado que aparentemente prefieren al amonio, pero este resultado varía mucho pues depende del tipo de suelo, el pH del mismo, la especie de planta, etc(23). Sin embargo, el amonio presenta el inconveniente de no permitir el paso de iones como el calcio y el magnesio en plantas que no están habilitadas para absorber amonio, dando como consecuencia una sintomatología característica de la falta de estos nutrientes(23).

En contraparte, el nitrato es el compuesto nitrogenado principal empleado por la mayor parte de las plantas, ya que puede ser absorbido y almacenarse en varios de sus tejidos sin causar daño alguno, además de ser la forma nitrogenada más abundante en el suelo(23).

1.4.6 Metabolismo del nitrato en las plantas

Una vez que el nitrato es absorbido por la raíz de la planta, éste debe convertirse a amoniaco para que el nitrógeno pueda participar en los procesos metabólicos(22,23).

La reducción de nitrato a amoniaco se efectúa en dos pasos, utilizando para ello a la Nitratoreductasa (NRA) y a la Nitritoreductasa (NRI) (Fig. 3). Una vez que el amoniaco se encuentra disponible dentro de la célula vegetal, ésta incorpora el nitrógeno vía varias rutas de síntesis para formar diversas moléculas, algunas de ellas ya mencionadas al principio de esta sección.

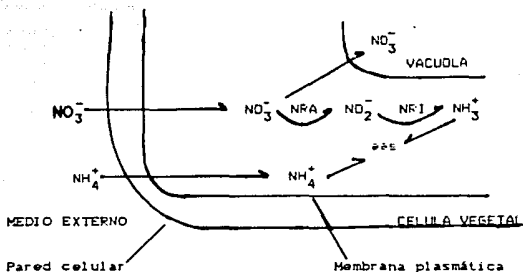


Figura 3.- Representación gráfica del metabolismo del nitrógeno en la célula vegetal. En el esquema NRA = Nitratorreductasa y NRI = Nitritoreductasa. Nota.- No se presenta el mecanismo que explica la entrada de nitratos al citoplasma y a la vacuola.

1.5 ABSORCIÓN DE NITRATOS POR LAS CELULAS DE LAS RAICES

La forma de entrada de los nitratos a las raíces de las plantas superiores, constituye uno de los temas que en bioquímica y fisiología vegetal han provocado gran controversia y discrepancia entre los estudiosos del tema.

Entre las décadas de los años 50 y 60, investigadores como Epstein y Hagen comenzaron a indagar sobre los eventos involucrados en la absorción de nitratos, encontrándose desde esta época que el pH del medio externo se alcalinizaba durante la absorción de estos iones por las raíces (25). Al finalizar la década de los 70 empezaron a dilucidarse otros fenómenos importantes que, en la literatura reciente, se continúan reportando cada vez con más detalle; entre ellos se encuentra el hecho de que el transporte de nitratos se induce únicamente por el ión NO_3^- (26,27,28,29,30), que el pH y la concentración de nitratos externos así como también algunos iones como el Ca^{2+} y el

Cl⁻ influyen en la velocidad de captación de los nitratos(19,29,31,32,33,35) y que probablemente existen por lo menos dos sistemas transportadores de nitratos ubicados en la membrana plasmática(19,29,30,32,34,36).

Esta serie de evidencias dieron pie a la propuesta de diversos modelos que explicaban de una u otra manera estas observaciones. Al respecto, Butz y Jackson(37) propusieron en 1977 un mecanismo para explicar el transporte y reducción de los nitratos en la células de las raíces; ellos pensaban que la molécula encargada de la reducción del nitrato era un tetrámero asociado a 3 monómeros de una ATPasa, localizado en la membrana plasmática. Según ellos, este complejo atrapaba y reducía al nitrato ingresante a la célula. Sin embargo, este modelo presentó una serie de inconvenientes tanto energéticos como estructurales que aunados a descubrimientos posteriores(como el que estableció que la captación y reducción del nitrato son dos procesos independientes) lo anularon. Durante la década de los 80, la utilización de métodos más precisos, como se verá a continuación, empezaron a resolver los detalles sobre las características del mecanismo involucrado en la absorción de nitratos.

1.5.1 Técnicas y sistemas biológicos empleados en el estudio de la absorción de nitratos

Las técnicas comúnmente usadas para este tipo de estudios son :

a) Las colorimétricas, empleadas en la determinación de los cambios en los niveles de nitratos contenidos ya sea dentro de los tejidos vegetales ó en las soluciones que rodean a las raíces durante los ensayos. Para las determinaciones colorimétricas, existen varias reacciones químicas a base de ácidos y/o bases, entre los que destacan el ácido perclórico(38), el ácido salicílico (39), la brucina(40) y el ácido fenoldisulfónico(31).

b) Los isótopos radioactivos como el $^{15}\text{NO}_3^-$ (26,27,41,42,43,44), $^{14}\text{NO}_3^-$ (27) y $^{18}\text{NO}_3^-$ (29,20,45,46) se han empleado para determinar las cantidades de nitratos que entran y salen de las células de la raíz durante ensayos de absorción de nitratos.

c) El uso de electrodos específicos para

nitratos(35,47,48,49); estos instrumentos pueden desempeñar las mismas funciones que las técnicas colorimétricas, con la diferencia de que en este caso las propiedades físico-químicas y eléctricas del electrodo aunadas a las de un aparato electrónico son las encargadas de detectar las concentraciones de nitratos.

d) Por último existe una técnica muy refinada utilizada para determinar los cambios de concentración de nitratos en los medios de incubación ó en muestras de tejidos vegetales de manera automática, esta técnica es la "HPLC" siglas que significan "High Performance Liquid Chromatography" (Cromatografía líquida de alta resolución)(33,50,51). Las lecturas obtenidas mediante esta técnica poseen la ventaja de ser muy precisas y confiables, ya que si se maneja adecuadamente, pueden identificarse específicamente los nitratos y descartarse las posibles fuentes de interferencia.

Estas técnicas de cuantificación de nitratos han sido herramientas de trabajo indispensables en el estudio de la absorción de nitratos.

Por otro lado, los sistemas biológicos en los que se han empleado estas técnicas han sido principalmente :

- a) Raíces aisladas de los demás componentes de la planta(25,27,28,34,35,43).
- b) Plantas ó plántulas completas(26,29,30,31,32,33).
- c) Cultivos de tejido ó células en suspensión(49).

Debe señalarse que estos sistemas provienen, la mayoría de las veces, de vegetales de interés comercial, como en el caso del maíz(*Zea mays*) (27,28,30,34,35,43), trigo(*T. aestivum*) (25,50,52,53), y la cebada(*Hordeum vulgare*) (25,29,31,33,45), si bien otros estudios se han enfocado hacia especies que poseen características genéticas, fisiológicas ó bioquímicas de especial interés, entre ellas encontramos a *Arabidopsis thaliana* (32), *Brassica napus* (54,55), *Lemna gibba* (45), *Zolium perenne* (56,57), y *Equisetum caldarium* (49), entre otros.

1.5.2 Energética de la absorción de nitratos y mecanismos propuestos

La absorción de nitratos en cualquiera de los sistemas biológicos que ya se mencionaron, requiere forzosamente de la

intervención de un mecanismo complejo(19). Los componentes que en la actualidad se propone conforman este mecanismo son :

a) Un sistema transportador de nitratos I ó 'constitutivo'(30,32,35,36,58).

b) Un sistema transportador de nitratos II cuya síntesis es inducida ~~de nove~~ una vez que las células de la raíz tienen contacto con los nitratos extracelulares(19,29,30,32,35,36,58).

c) Una ATPasa-H⁺ ubicada en la membrana plasmática.

Con base en los diversos estudios realizados sobre este tema, se propone en términos generales, que este mecanismo funciona de la siguiente manera: Una vez que las células vegetales tienen contacto con los nitratos, estos aniones comienzan a penetrar a través del transportador de nitratos "constitutivo" ó de "alta afinidad" , logrado ésto se comienza a sintetizar el sistema transportador de nitratos II denominado de "baja afinidad", el cuál se propone lleva a cabo la absorción de nitratos en un transporte simporte $\text{NO}_3^-:2\text{H}^+$ (19,35,36).

El aporte de los protones necesarios para llevar a cabo este transporte lo realizan las ATPasas-H⁺ localizadas en la membrana plasmática, de las cuáles se conoce entre otras características que bombean protones al exterior(59), se piensa además que al descender la concentración de protones en el medio externo a consecuencia del transporte de los nitratos y de otros iones, la ATPasa-H⁺ aumenta su actividad(19).

Sin embargo existen también otros estudios cuyos resultados parecen ir en contra de lo postulado en este modelo; dentro de estas discrepancias se tiene que al medir el pH de los medios circundantes a las raíces, éstos se alcalinizan(19) en lugar de acidificarse(como debería suceder a consecuencia de la actividad de la ATPasa-H⁺ de la membrana plasmática). En otras pruebas con raíces de maíz, al usarse inhibidores de la ATPasa-H⁺ de membrana plasmática se encontró que el proceso de absorción de nitratos no se vió afectado en lo más mínimo(19). Por otra parte en especies como *S. tuberosa* el medio alcalino es el que favorece la absorción de nitratos(32). A la luz de estas discrepancias se han propuesto otros modelos como el de Thibaud y Grignon (19,36) quienes sugirieron un mecanismo antiporte $2\text{NO}_3^-/\text{OH}^-$.

Para el caso de la vacuola, que es el organelo donde se

acumulan los nitratos en la célula vegetal, existe un conocimiento mucho menor acerca de la manera en cómo se transporta este anión hacia su interior(19). En este sentido Schumaker y Sze(50) en un estudio llevado a cabo en vesículas de tonoplasto(membrana de vacuola) aisladas de raíces de avena, encontraron evidencias para pensar que el transporte de nitratos hacia el interior de las vacuolas está acoplado al transporte de protones, y que dependiendo de la disponibilidad del anión dentro de la misma, así como también de la demanda del metabolismo celular, estos sistemas de transporte pueden movilizar los nitratos almacenados en la vacuola para usarse en el citoplasma. Los mecanismos que se citan para llevar a cabo esto son : un mecanismo tipo simporte para la movilización de los nitratos del citoplasma hacia el interior de la vacuola y un mecanismo antiporte para su salida. El gradiente de protones generados por la ATPasa- H^+ y la PPasa- H^+ del tonoplasto,

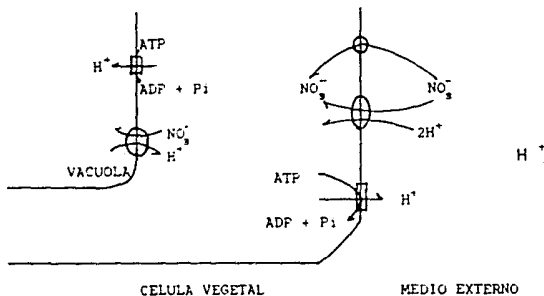


Fig 4.- Modelo integral que explica la absorción de nitratos. Tomado de(19,29,36,49,60).

1.5.3 Regulación de la absorción de nitratos

Una vez que los sistemas de absorción de nitratos (véase el punto 1.5.2) se encuentran funcionando en su máximo nivel, los nitratos se acumulan en la vacuola ó son reducidos en el citoplasma, pero después de un cierto tiempo a la vez que las raíces se encuentran absorbiendo nitratos del medio externo, comienza a producirse el fenómeno denominado 'eflujo' ó 'salida' de nitratos (19,26,27,29,30,36,45,47,49,58). El por qué se produce ésta salida de nitratos no se sabe con certeza; algunos autores piensan que se debe a que las células alcanzan una concentración crítica de nitratos en el citoplasma (19,27,49,58) y otros, a que productos de la reducción de estos nitratos son los que la provocan (19,52). De cualquier modo, éste mecanismo regulador ciertamente es muy fino y sensible a los cambios de concentración de nitratos.

1.5.4 Cinética de la absorción de nitratos

1.5.4.1 Efecto de la concentración externa de nitratos

La concentración de nitratos presente en las soluciones, influye en el lapso de tiempo necesario para completar la fase de "inducción" (fase en la que se propone se sintetiza *de novo* el sistema transportador de nitratos II), pues a medida que aumenta la concentración de nitratos del medio circundante a las raíces, el tiempo que se requiere para completar la "inducción" es menor. La toma de nitratos post-inducción también se encuentra influenciada por la concentración de nitratos presentes en el medio, pues aumenta su velocidad a medida que se incrementa la concentración de los mismos (28,29,30,50).

La dependencia que existe entre la absorción de nitratos y la concentración externa de los mismos en plantas superiores podría deberse a una de las siguientes hipótesis que menciona Shamm (50)

a) Que existan dos sistemas distintos de toma ó acarreadores: uno que funciona a bajas concentraciones de nitratos y el otro en altas (del cuál ya se habló con detalle en el punto 1.5.2).

b) Un sistema de toma con distintas fases que dependen de la concentración.

c) Un acarreador saturado con un componente de difusión.

En la mayor parte de las investigaciones citadas, las características detectadas en el estudio del transporte de nitratos pueden explicarse en base a la propuesta del inciso a).

Para los dos transportadores propuestos, se han obtenido sus valores de constantes de afinidad (K_m), observándose diferencias entre las especies y aún en los valores de una misma especie. En trigo (*Triticum sp.*) se ha reportado para el sistema I (constitutivo) una K_m de 0.027 mM (50), en maíz (*Zea mays*) de 0.023 mM (30), en *Lemna sp.* 0.033 mM (31), en *A. thaliana* 0.040 mM (32), y de 0.001 a 0.025 mM para cebada (*Hordeum vulgare*) (31, 37).

Para el caso del sistema II los valores oscilan entre 7.5 mM para el trigo (*Triticum sp.*) (50) y 25 mM para *A. thaliana* (32) siendo éstos números siempre mayores que los del mecanismo I.

Como se mencionó, los valores de K_m se han determinado en raíces disecadas, en plántulas completas ó en cultivo de tejidos y nunca con la proteína(s) purificada, lo que puede explicar las variaciones en los valores de la K_m para los sistemas transportadores de nitratos aún cuando se halla llevado a cabo el estudio en el mismo sistema biológico.

1.5.4.2 Efecto del pH

Los efectos que causa el pH en la mayoría los sistemas estudiados son los siguientes: la absorción de nitratos en cebada (*H. vulgare*) (25, 31), *Lemna sp.* (60), maíz (*Z. mays*) (35) y avena (*Avena sativa*) (60) decrece con el incremento del pH externo, en este sentido Mc Clure et al (38) encontraron que a pH 8 y por arriba de éste la inhibición de la toma de nitratos en maíz fue completa. Por otra parte, la absorción de nitratos se incrementa en los mismos sistemas con un pH ácido, probablemente debido a un decremento en el potencial negativo de las células de la raíz (36). A pH alto la competencia de los iones OH^- con los nitratos podría ser lo que causa la reducción de la absorción de los nitratos (36). Antes de continuar debo mencionar que éstas observaciones son consistentes con el modelo donde se propone la participación de un mecanismo simporte $NO_3^-/2H^+$ (véase punto 1.5.2).

En el caso de *S. Malvaceae*, su comportamiento ante el pH es diferente, como lo mencionan Doddema y Teikamp(32) quienes reportan una absorción de nitratos óptima alrededor de pH 8. A pH's por arriba de 9.5 y abajo de 4.5 *S. Malvaceae* no sólo deja de absorber nitratos, sino que también expulsa una sustancia no identificada que absorbe a 210nm(32), no encontrándose hasta el momento una explicación satisfactoria de este comportamiento.

1.5.4.3 Inhibidores de la absorción de nitratos

La toma de nitratos puede verse alterada negativamente por el efecto de : bajas temperaturas, medios anaeróbicos e inhibidores del metabolismo(19,31,54,55).

En lo que toca a los inhibidores del metabolismo, se ha encontrado toda una gama de ellos que inhiben la absorción de nitratos. Algunos de estos inhibidores son: el DES(Diethylstilbestrol) y el vanadato, los cuales en experimentos llevados a cabo en raíces de maíz(31,38,52) provocaron una inhibición de la respuesta al nitrato. Debe resaltarse el hecho de que estos dos inhibidores se han reportado como inhibidores específicos de la ATPasa-H⁺ de membrana plasmática(59) lo que concuerda con la necesidad de un gradiente de protones para la óptima absorción del nitrato vía el mecanismo de simporte.

Otros inhibidores son el PGO(Fenilglioxal) y el amonio, reportándose en la literatura que el PGO inhibe tanto la toma de cloro, como la absorción de nitratos en raíces de maíz, interactuando directamente con los sistemas de transporte de nitratos e indirectamente con la bomba de protones(31,34,38). Por su parte el ión amonio a ciertas concentraciones disminuye la entrada de nitratos a las raíces y en otras la inhibe completamente(19,44,46,47,48).

La puromicina y la cicloheximida, que son inhibidores de la síntesis de proteínas impiden el desarrollo de la síntesis del sistema transportador II de la absorción de nitratos(el que debe sintetizarse *de novo*)(52,62).

1.5.4.4 Factores que contribuyen a incrementar la toma de nitratos

Algunas de las condiciones que favorecen la absorción de nitratos son : condiciones aeróbicas(19), temperatura alrededor de 30°C(31,54,55) y la presencia en la solución de algunos cationes como el potasio(K⁺) y el calcio(Ca²⁺)(31,36).

Se encuentra bien documentado que el potasio incrementa la absorción de nitratos(31,36,53), siendo una posible explicación de ello, que la ATPasa-H⁺ de membrana plasmática incrementa su actividad con este catión(59), aumentando entonces el gradiente de protones que facilita el ingreso del nitrato externo vía el mecanismo simporte NO₃⁻/2H⁺. Por su parte la presencia del calcio en los medios de absorción de nitratos, ayuda a mantener la estructura y funcionalidad de las membranas de las células de la raíz en óptimas condiciones, lo que confiere a estas raíces la habilidad de soportar condiciones de estrés salino(31,33).

1.6 SITUACION DE LA PRODUCCION DE TRIGO EN MEXICO

En países desarrollados que son grandes exportadores de trigo como es el caso de E.U.A y Australia(Fig. 5), sus formidables producciones de trigo se deben entre otros factores a que poseen tierras con sistemas de irrigación artificial, semillas con alta calidad, fertilizantes adecuados y buenas condiciones de almacenamiento entre otros (64).

Por el contrario en países que son productores, pero que también son importadores como es el caso de México, existe toda una problemática que ocasiona un bajo nivel de producción(64). Por ejemplo, los fertilizantes que tienen la finalidad de incrementar la producción, en muchas ocasiones son aplicados en exceso(64). A este respecto, según datos aportados por el CIMMYT(Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y del Trigo), en México se aplican un promedio de 250 kg de fertilizante por hectárea de los cuales el 66 % lo ocupa el nitrógeno y el resto el fósforo, en comparación con los mayores productores como lo son Australia y E.U.A, que aplican mínimas cantidades de fertilizantes

y con un mejor equilibrio en el contenido de sus fórmulas(Fig. 6).

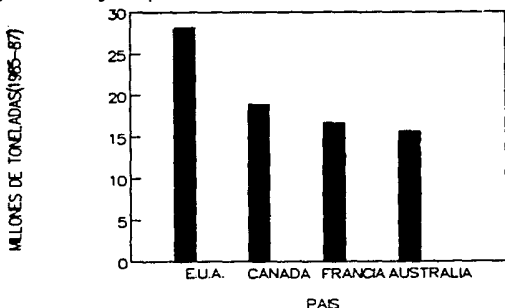


Figura 5. - Niveles de producción de trigo a nivel mundial. La gráfica muestra la producción de trigo de los principales países exportadores a nivel mundial, durante el bienio(1985-87)(tomada de (64).

El empleo indiscriminado de estos fertilizantes se debe principalmente a los grandes subsidios; p.e. en la mayoría de los grandes productores no se asignan subsidios a los fertilizantes, quedando el valor de 1 kg de fertilizante igual a 2-4 kg de trigo, en cambio en países como Arabia Saudita , Argelia y México, el abundante subsidio de los fertilizantes hace que el precio de 1 kg de fertilizante sea igual a uno de trigo (64).

Además, contrario a lo que se pudiera pensar, en México, como en otros países en desarrollo que aplican exceso de fertilizantes, no se obtiene incremento alguno en la producción de granos y semillas de trigo, debido tal vez, al mal equilibrio de los nutrientes empleados (N,P y K), ó a las prácticas generales de cultivo, como el uso de plaguicidas, herbicidas, etc (64).

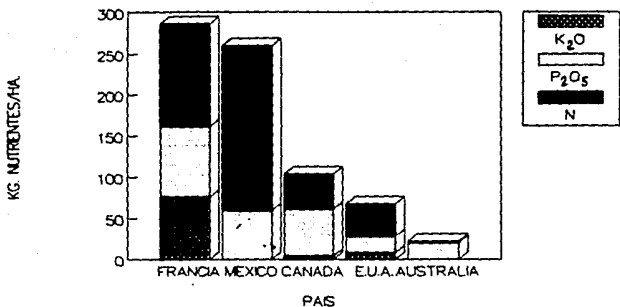


Figura 6. - Niveles de fertilizantes empleados en trigo por los mayores exportadores y México. (Gráfica construida con los datos reportados en (64)).

Por aún resulta el hecho de que a base de grandes esfuerzos, se logra la preciada producción de semillas y por falta de una adecuada infraestructura para un buen almacenamiento de estas, se suma una pérdida extra provocada por daños causados por factores físicos (excesiva humedad y temperatura en el silo) y/o bióticos (ataques por distintas plagas). Es por ello que la investigación sobre todo lo relacionado con la calidad de semillas y su almacenamiento es de suma importancia actualmente.

O
B
J
E
T
I
V
O
S

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL :

Evaluar el efecto que causa el deterioro físico de las semillas sobre la absorción de nitratos en las raíces de las plántulas correspondientes.

OBJETIVOS PARTICULARES :

- Determinar la viabilidad y velocidades de germinación y crecimiento en semillas control y deterioradas.
- Determinar los estados de desarrollo equivalentes en las semillas deterioradas y control.
- Determinar la cinética de absorción de nitratos en las raíces de las plantas procedentes de los lotes de semillas control y deteriorado, durante las primeras ocho horas de contacto con este anión bajo las siguientes condiciones:
 - a) Ante distintas concentraciones de nitrato (0.3 a 10 mM).
 - b) Usando diferentes valores de pH (4.5, 6.0 y 7.5).

HIPOTESIS :

Si el vigor de las plántulas provenientes de semillas deterioradas se ve disminuido, entonces es posible que un sistema bioquímico importante para el crecimiento de la plántula como es el de absorción de nitratos se encuentre afectado negativamente.

M
E
T
H
O
D
O
L
O
G
I
A

METODOLOGIA

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

La variedad de trigo (*Triticum aestivum*) en estudio fue Salamanca cosecha 88-89, adquirida en la productora Nacional de Semillas (PRONASE), siendo su porcentaje de germinación de 99%. Para su conservación se almacenó en un cuarto sin luz, a 4°C, y manteniendo el contenido de humedad (C.H) de la semilla en 10 %. Cabe señalar que ésta semilla se encontraba ya tratada con un fungicida llamado CAPTAN, para evitar la proliferación de patógenos.

3.2 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DE LA SEMILLA

Una vez adquirida la semilla, se procedió a evaluar el porcentaje exacto de su contenido de humedad para considerarlo en las operaciones de deterioro. Para determinar éste parámetro, se colocaron aproximadamente 30 semillas en cajitas de aluminio previamente pesadas. Acto seguido se pesaron las semillas en las cajas en una balanza analítica (peso fresco de las semillas), para después secarlas en un horno de alta temperatura a 115°C durante 18 horas (11,17). Al momento de sacar las cajas con las semillas, se introdujeron en un desecador por espacio de 10 min., para luego proceder a determinar su peso (peso seco de las semillas). Los datos obtenidos se sustituyeron en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ C.H.} = \frac{(P.f. - P.s.)}{P.f.} \times 100$$

en donde:

C.H. = Contenido de humedad del grano o semilla.

P.f. = Peso fresco de la semilla

P.s. = Peso seco de la semilla

La determinación del porcentaje de contenido de humedad (% C.H.), se realizó un mínimo de 5 veces, por lote.

3.3 DETERIORO DE LA SEMILLA

Para simular las condiciones a las que se ve sometido un lote de semillas durante un inadecuado almacenaje ocasionado por altas temperaturas y humedad, se ha propuesto un método denominado "envejecimiento acelerado de semillas", que consiste en elevarles el contenido de humedad (a 17% para el caso del trigo), y almacenarlas después con temperatura y humedad relativa (H.R.) altas y posteriormente secarlas (11,17,61). El procedimiento fue el siguiente:

3.3.1. Ajuste del contenido de humedad de la semilla por deteriorar

Esta operación consistió en incorporar agua destilada a las semillas, agitando vigorosamente por espacio de una hora o hasta que finalmente el agua se incorporase a las semillas; después de lo cual el frasco fue cubierto con un trozo de papel "Parafilm" al que se le hicieron 4 perforaciones. Este frasco se introdujo en un refrigerador a 4°C durante 12 horas, con el fin de que la humedad se distribuyera uniformemente (11). La cantidad de agua requerida para elevar el contenido de humedad de las semillas, se calculó según la fórmula:

$$\text{Volumen de agua} = \frac{(100 - \% \text{ C.H. } a - 1) (C)}{(100 - \% \text{ C.H. } b)}$$

en donde:

- % C.H. a = Porcentaje del contenido de humedad inicial de la semilla (10% para este caso).
- % C.H. b = Porcentaje del contenido de humedad final al que se desea dejar la semilla. (17 % para este caso).
- C = La masa del lote de semillas expresada en gramos.
Referencia (11,17)

3.3.2. Preparación de la cámara de deterioro

En una caja hermética de plástico (35cm x 25cm x 15cm) se vertió 1 litro de una solución saturada de KCl, que dió una humedad relativa interior del 85% dadas sus propiedades coligativas (11,61). Sobre la solución se colocó una rejilla de plástico, con el fin de colocar sobre de ella a las semillas y que de ésta forma la humedad se distribuyera uniformemente. Posteriormente se selló la caja con cinta adhesiva y se guardó en una estufa de cultivo (modelo FE-131) a temperatura constante de 42 ± 1 °C durante 5 días.

3.3.3 Término del proceso de deterioro

Después de los 5 días de deterioro, se sacaron de la cámara las semillas, para secarlas a temperatura ambiente durante 12h. Al finalizar ésto, se tomó una muestra del lote deteriorado a la que se le determinó el % C.H. final. Finalmente se procedió a guardar las semillas deterioradas en un cuarto a 4°C.

3.4. EVALUACION DEL VIGOR Y VIABILIDAD DE LOS LOTES CONTROL Y DETERIORADO

Para determinar el daño ocasionado por el deterioro a las semillas, se llevaron a cabo las siguientes pruebas, tanto en el lote deteriorado como en el control:

3.4.1. Cinética de crecimiento

Esta prueba es la más utilizada para evaluar el vigor de un lote de semillas (8,11,17). En el fondo de una caja de plástico, se colocó una hoja de papel filtro grueso, que se humedeció a saturación con una solución 0.1 mM de CaCl_2 (34), sobre la cuál se distribuyeron 100 semillas de cada lote lavadas previamente en agua destilada para retirar el exceso de CAPTAN, posteriormente se cubrieron con otra hoja saturada con la solución ya indicada.

La cámara se incubó a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con fotoperíodo natural. A los 3,4,5,6 y 8 días de haber sido sembradas, se disecaron 20 plántulas, separando el endospermo del coleoptilo y de la raíz. Estas tres partes se introdujeron por separado en cajitas de aluminio previamente pesadas, para después meterlas a un horno a 115°C durante 24 horas; al concluir el secado, se introdujeron a un desecador para su enfriamiento antes de ser pesadas nuevamente. Con esto se estableció la cantidad de materia seca acumulada a través del tiempo. Los resultados que aparecen en las Figuras 12,13 y 14 se expresaron como "% peso seco/plántula", el cual se derivó de la siguiente expresión:

$$\% \text{ peso seco de la raíz} = (100\% - (\% \text{ peso seco del coleoptilo} + \% \text{ peso seco del endospermo}))$$

Siendo el 100% el peso seco de la plántula completa.

3.4.2. Velocidad de germinación

La curva que se deriva de esta prueba, evalúa tanto la rapidez con que germinan las semillas de un lote, como la viabilidad del mismo (8,11,17). Para llevarla a cabo, las semillas se manipularon en la misma forma que en la prueba anterior, con la variante de que en vez de disecar, lo que se hizo fue contar cada 24 horas el número de semillas germinadas (considerando que una semilla germinada era aquella que tenía protuida su radícula principal), hasta completar 8 días.

Una vez concluido este punto, se procedió a calcular el valor del Coeficiente de Velocidad de Germinación (C.V.G)(14) para poder comparar estadísticamente las dos curvas generadas en este experimento.

De los resultados obtenidos de las pruebas de vigor y viabilidad, se seleccionaron los días de cosecha para la parte de los experimentos relacionados con la absorción de nitratos, la selección se hizo de tal manera que en el día de cosecha ambos lotes tuvieran el mismo % de peso seco por plántula en sus raíces.

3.5. DETERMINACION DE LA ABSORCION DE NITRATOS A UN pH CONSTANTE DE 6

En la literatura, el estudio de la absorción de nitratos, se ha llevado a cabo por diversos métodos (véase punto 1.5.1); dado que para este trabajo se requería de una técnica accesible, precisa, no muy laboriosa ni de larga duración, se optó por modificar el diseño empleado por diversos autores (31,35,63).

Cien semillas de trigo de cada lote fueron sembradas en las mismas condiciones que se utilizaron para la cinética de crecimiento. A los 5 días de haberse sembrado el lote deteriorado, se separaron las raíces de la plántula para sumergirlas inmediatamente en agua bidestilada fría y aerada durante 15 min.. Posteriormente se pesaron 3 gramos de las raíces en tubos de ensayo fríos, a las que se les añadían 30 ml de una solución con 0.3, 1.0, 3.0, 5.0, 7.5 ó 10.0 mM de nitratos (Ver Fig.7). Las soluciones contenían KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (estando presente por cada molécula de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, dos de KNO_3), 0.25 mM de MES/KOH pH 6.0 y 0.5 μM de Na_2MoO_4 . El período total de absorción fue de 8 horas manteniendo un flujo de aire constante en la solución y una temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Cada 2 horas se tomó una alícuota de 1.7 ml de la solución, la que después se utilizó para determinar la concentración de nitratos disminuída del medio, asumiendo que correspondía a la cantidad absorbida por las raíces. Los experimentos se repitieron un mínimo de 9 veces.

3.5.1 Determinación de la toma de nitratos en soluciones con otros pH

Dado que el pH juega un papel muy importante en la absorción de nutrientes y en especial para el caso de los nitratos, se decidió estudiar el efecto que tiene el pH en la absorción de nitratos por las plántulas provenientes de semillas deterioradas siguiendo la metodología reportada por Rao y Rains (31). Para cuantificar este efecto, se probaron las soluciones que contenían 3.0, 7.5 y 10mM de nitratos en las raíces de ambos lotes, pero ahora con un pH de

DISEÑO EXPERIMENTAL

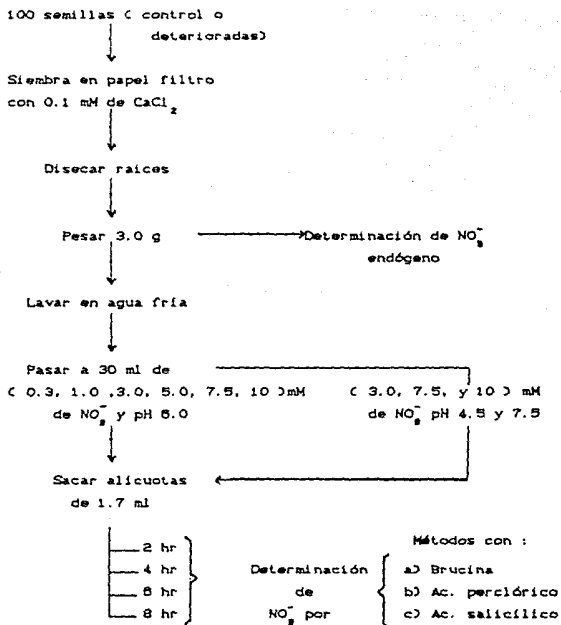


Fig 7. - Procedimiento para estudiar la toma de nitratos en las raíces de los lotes de trigo control y deterioradas.

4.5 y 7.5 . El ajuste del pH 4.5 se hizo añadiendo HCl(12.1N) y el de 7.5 con KOH(1M). en ambos casos no se añadió solución amortiguadora. Las demás condiciones fueron las mismas que en el experimento anterior. Los experimentos se repitieron 3 veces.

3.6. DETERMINACION DE NITRATOS

Los nitratos fueron determinados según 3 diferentes métodos de acuerdo al experimento. En todos los casos cada muestra se determinó por triplicado y a su vez cada lote de muestras procedentes de un experimento se determinaron por duplicado. Cada experimento se llevó a cabo al menos 3 veces.

3.6.1. Método con ácido perclórico. Se siguió el procedimiento citado por Cavse(38).

Este método se basa en la absorción que presenta el ión nitrato al ponerlo en un medio con ácido perclórico con al 5% y leerlo a 210 y 300 nm. La mayor sensibilidad de este método se reporta a 210 nm.(38).

Para la construcción de la curva patrón(Fig.8), se depositaron alícuotas que contenían entre 5 y 80 μg de nitratos a partir de una solución "stock" con 3225.81 μg de NO_3^- / ml en tubos de ensayo de 100 x 12 mm, ajustándose el volumen a 1.0 ml con agua destilada y añadiendo 2.0 ml de ác. perclórico al 5%. El blanco se preparó con 1.0 ml de agua destilada y 2.0 ml de ác. perclórico al 5%. Al cabo de 10 min. se leyó la absorbencia a 210 nm en un espectrofotómetro Beckman mod. DU-65. El rango lineal de la curva se encontró entre 5 y 40 μg de nitratos.

Para el caso de las muestras, se añadieron alícuotas que contuvieran entre 5 y 40 μg de nitratos, agregándose agua destilada hasta completar un volumen total de 1.0 ml . Al final se adicionaron los 2.0 ml de ác. perclórico al 5%.

3.6.2. Método con brucina. Se siguió el método citado por Snell(40)

CURVA PATRON DE NITRATOS METODO DEL AC. PERCLORICO

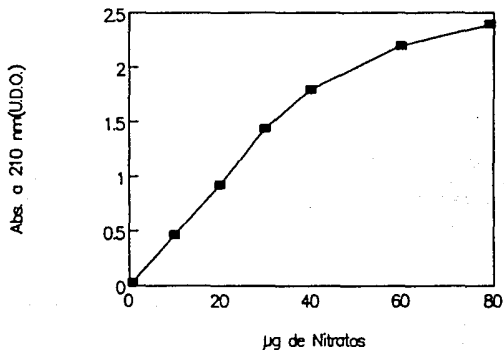


Figura 8.- Curva patrón de nitratos según el método del ácido perclórico(38).

La reacción por medio de la cual se detecta al ion nitrato, es la oxidación de la brucina(calcaloide de alta toxicidad). El compuesto resultante es de color amarillo(40).

La curva patrón(Fig. 9) se elaboró colocando en tubos de ensayo de 80 x 150 mm una muestra que contuviera entre 5 y 80 μg de nitratos, completando a 1.0 ml con agua destilada. Se adicionaron 20 μl de una solución de brucina al 5% disuelta en cloroformo y preparada ese mismo día, agregándosele posteriormente 2.0 ml de ácido sulfurico concentrado y agitando vigorosamente en el vortex durante 1 minuto ó hasta que la mezcla virara de incoloro a un color amarillo. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente. Una vez fria, se añadieron lentamente 2.0 ml de agua destilada agítandola nuevamente hasta la total homogenización de la mezcla. Se enfriaron los tubos en hielo y se leyeron en el espectrofotómetro Beckman a 410 nm. Para el caso de las muestras se añadieron alícuotas que contenían entre 5 y 40 μg (que es el rango lineal de la curva patrón) a 1.0 ml de agua y todos los demás reactivos.

3.6.3. Método con ácido salicílico. Se siguió el procedimiento citado por Cataldo *et al*(39)

Este método se basa en la oxidación que sufre el ác. salicílico al ponerlo en contacto con los nitratos; el compuesto que se forma es de color amarillo(39).

El ensayo se llevó a cabo en tubos de vidrio con las mismas dimensiones que en el método anterior. Para la construcción de la curva patrón(Fig. 10) se colocaron alícuotas del stock que contuvieran de 5 a 80 μg de nitratos agregando después agua destonizada para tener finalmente un volumen de 100 μl ; a continuación se adicionaron 400 μl de una solución de ácido salicílico al 5% disuelto en ácido sulfurico concentrado, se agito y dejó reposar la mezcla por 20 minutos aproximadamente. Por último se agregaron 9.5 ml de NaOH 2N observandose un cambio de incoloro a un color amarillo; se leyeron las muestras en el espectrofotómetro a 410 nm.

CURVA PATRON DE NITRATOS METODO DE BRUCINA

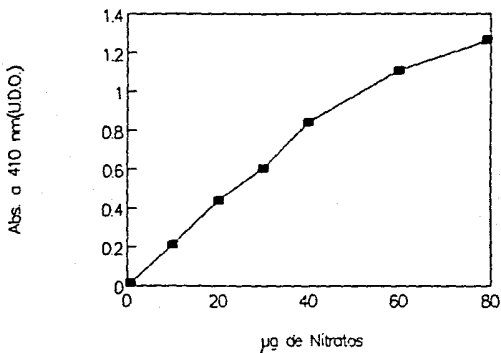


Figura 9.- Curva patrón de nitratos según el método de Brucina(40).

CURVA PATRON DE NITRATOS METODO DEL AC. SALICILICO

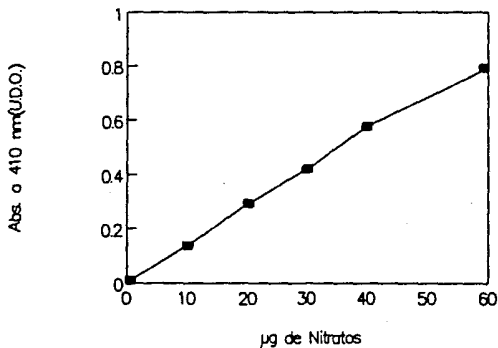


Figura 10.- Curva patrón de nitratos según el método del ácido salicílico(39).

En el caso de las muestras problema, como en los dos métodos anteriores, se agregaron alícuotas que contenían entre 5 y 40 µg de nitratos (que es el rango lineal de la curva) a los 100 µl de agua destilada, después de lo cual se procedía de la forma ya señalada.

3.7 DETERMINACION DEL NITRATO ENDOGENO DE LAS RAICES

Para conocer la cantidad inicial de nitratos presentes en el tejido radicular de las plántulas utilizadas en los experimentos de absorción de nitratos, se procedió de la siguiente manera :

De plántulas control y deterioradas con 4 y 5 días de edad respectivamente, se pesaron 5 gr de raíz fresca por separado. Estas raíces se desecaron en cajitas de aluminio en el horno a 115°C durante 18 horas. Inmediatamente después se pesaron en la balanza analítica. De estas muestras secas, se tomaron 100 mg por cada lote para triturarlas en un mortero; el polvo resultante se mezcló con agua bidestilada en un tubo a 70°C, agitándose vigorosamente en el vortex durante 1 minuto. Estos tubos se incubaron por 1 hora a 60°C, para inmediatamente después centrifugarlos a 5000 g por 15 minutos. El sobrenadante se guardó para realizar las pruebas colorimétricas de determinación de nitratos posteriormente.

3.8. METODOS ESTADISTICOS

3.8.1. C. V. G.

El C.V.G. (Coeficiente de Velocidad de Germinación) enunciado por Slowski(14), se calculó para los lotes de semilla control y deteriorado, usándose para ello la fórmula :

$$C.V.G. = \frac{\sum n \times 100}{\sum (D.n)}$$

en donde :

n = El número de semillas germinadas cada día.

D = El número de cada día después del " día cero " (día de siembra).

Los C.V.G. obtenidos se compararon con la prueba estadística T de student ($p < 0.05$).

3.8.2. Velocidad de crecimiento

Los datos de la sección 3.4.1. se sometieron a una correlación y regresión lineal simples.

Una vez definidos los parámetros de modelo lineal $y = mx + b$ donde m es la tasa de velocidad con que ganaron ó perdieron peso dependiendo de la parte de la plántula que se tratase, se procedió a comparar la " m " de ambos lotes por medio de la prueba estadística "Comparación de las pendientes de dos curvas" ($p < 0.05$) (65).

Para saber si existían o no diferencias significativas entre tres ó más tratamientos se utilizó la prueba ANALISIS DE VARIANZA ($p < 0.05$) (58).

R
E
S
U
L
T
A
D
O
S

RESULTADOS

4.1 OBTENCION DEL LOTE DETERIORADO DE SEMILLAS

El contenido de humedad de la semilla adquirida fue del 10% aproximadamente (Tabla I), encontrándose en un nivel adecuado para su inmediato almacenamiento. Cuando se procedió a ajustar la humedad para la obtención del lote deteriorado, las semillas alcanzaron cerca del 17% antes de ingresar a la cámara de deterioro; después de 5 días el lote de semillas deterioradas tuvo un 15% de contenido de humedad (véase la Tabla I).

Tabla I.- Porcentajes de contenido de humedad. Se muestran los niveles de humedad de los lotes de semilla control y deteriorado. Los valores son la media de 5 determinaciones.

Lote	% Contenido de humedad
Control	10.6
Deteriorado	16.8 *
	15.2 **

* Antes de ingresar a la cámara de deterioro.

** Después de los 5 días de deterioro.

4.2 VIGOR Y VIABILIDAD DE LOS LOTES DE SEMILLA CONTROL Y DETERIORADO

Con la finalidad de establecer los estadios de desarrollo equivalentes entre los dos lotes de semillas, así como también

determinar el posible daño que se ocasionó a las semillas con el deterioro, se llevaron a cabo las pruebas de velocidad de germinación y crecimiento descritas en la Metodología.

Los datos obtenidos del experimento de velocidad de germinación se muestran en la Fig.11. Analizando estas curvas se observa que el proceso de germinación se encuentra retrasado aproximadamente en 24 horas con respecto al lote control a consecuencia del deterioro y que el porcentaje de semillas germinadas disminuyó del 90 al 95%.

Para saber si las diferencias en la germinación eran o no significativas, se procedió a calcular los Coeficientes de Velocidad de Germinación, los cuales se muestran en la Tabla II, estos coeficientes fueron significativamente distintos entre sí según lo indicó la prueba estadística "T de Student" ($p < 0.05$).

Tabla II.- Coeficientes de velocidad de germinación. Se muestran los C.V.G. de los lotes de semilla control y deteriorado.

Lote	Coefficiente de Velocidad de Germinación
Control	43.64 \pm 1.28
Deteriorado	35.14 \pm 0.20

Los valores son la media \pm desviación estándar (n=3)

Los valores son significativamente distintos ($p < 0.05$); t observado = 11.25, t tablas = 2.8.

Por otra parte, las raíces y los endospermos de las plántulas provenientes de semillas deterioradas, presentaron también diferencias significativas ($p < 0.05$) en las tasas de crecimiento cuando se compararon por medio de la prueba "Comparación de las pendientes de dos curvas" con las correspondientes del lote control (véase la Tabla III y las Figs. 12,13). En lo concerniente a los coleóptilos (Fig.14), no se encontró diferencia significativa alguna ($p < 0.05$) cuando se comparó la cinética de crecimiento del lote control y la del deteriorado.

VELOCIDAD DE GERMINACION

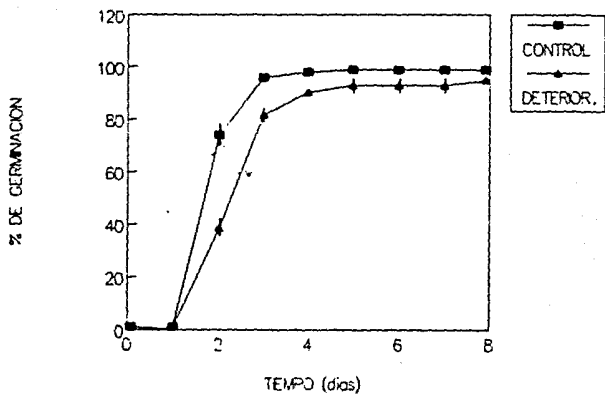


Figura 11.- Velocidad de germinación de los lotes de semilla control y deteriorado. Cada 24 horas se contó el número de semillas germinadas en cada lote. Los puntos son la media de 3 determinaciones.

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

RAIZ

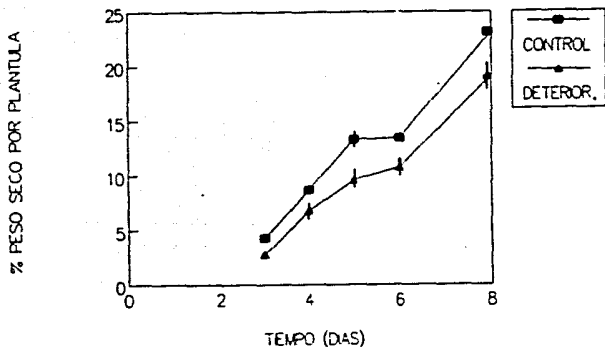


Figura 12.-Velocidad de crecimiento de la raíz. Se muestra el incremento de masa en las raíces de las plántulas a través del tiempo expresada como el % de peso seco/plántula, de los lotes de semilla control y deteriorado. De estos datos se seleccionaron los días 4 para el control y 5 para el deteriorado para cosechar dada la similitud proporcional de los valores en ambos lotes. Los puntos representan la media de 3 determinaciones.

VELOCIDAD DE DEGRADACION DEL ENDOSPERMO

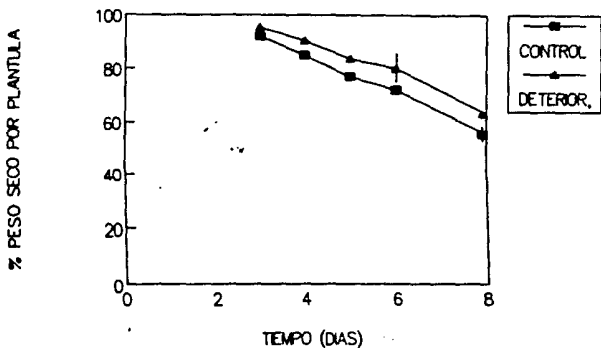


Figura 13.- Velocidad de degradación del endospermo. Se muestra el consumo de los materiales de reserva contenidos en el endospermo de los lotes de semilla control y deteriorado a través del tiempo. Los puntos representan la media de 3 determinaciones.

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO COLEOPTILO

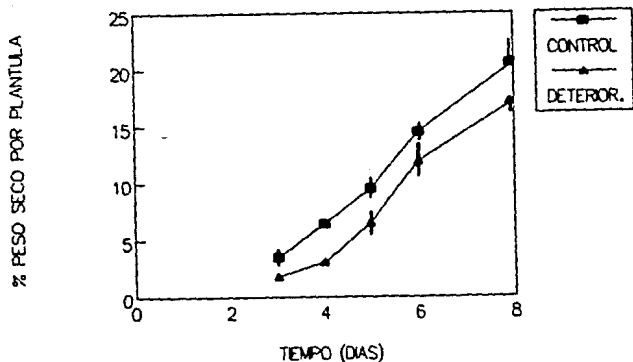


Figura 14.- Velocidad de crecimiento del coleoptilo. Se muestra el incremento de masa de los coleoptilos de los lotes de semilla control y deteriorado a través del tiempo expresado como % de peso seco/ plántula. Los puntos representan la media de 3 determinaciones.

Tabla III.- Tasas de crecimiento. Se presentan las tasas de crecimiento de las partes de las plántulas procedentes del lote control y deteriorado.

Parte	Lote	Tasa de crecimiento (% peso seco plántula día ⁻¹)	Diferencias significativas (p < 0.05)	
Raíz	Control	3.55 [±] 0.03	a	Si hubo
	Deteriorado	3.09 [±] 0.25		
Coleoptilo	Control	2.66 [±] 0.51	b	No hubo
	Deteriorado	2.24 [±] 0.13		
Endospermo	Control	5.51 [±] 0.25	c	Si hubo
	Deteriorado	4.47 [±] 0.43		

Los valores son la media \pm desviación estándar (n=3).

a T tablas = 3.182; Observada = 3.52

b T tablas = 3.182; Observada = 2.25

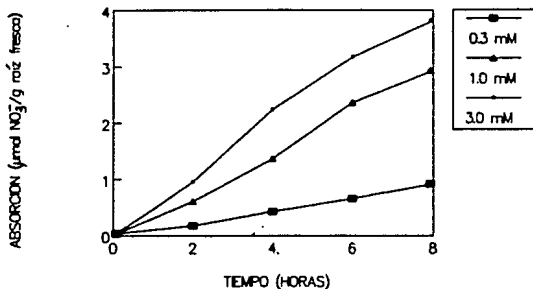
c T tablas = 3.182; Observada = 0.15

4.3 DETERMINACION DE LA ABSORCION DE NITRATOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES A pH 6

Con el fin de llevar a cabo el análisis de lo que estaba ocurriendo con la absorción de nitratos en las raíces provenientes de los dos lotes de semilla, se optó por graficar las curvas que describen la absorción en dos principales conjuntos, uno de ellos involucra a las concentraciones "bajas" (0.3 a 3.0mM de nitratos) y el otro a las "altas" (5.0 a 10mM de nitratos), de acuerdo a experimentos preliminares.

En el primer grupo (Fig. 15 y Tabla IV), se aprecia una absorción de nitratos similar en los dos lotes, la cuál fue proporcional a la concentración de nitratos del medio, aunque después de las 6 horas existió un comportamiento irregular por parte del lote deteriorado en las concentraciones de 0.3 y 1.0mM.

ABSORCION DE NITRATOS pH 6.0 CONTROL



ABSORCION DE NITRATOS pH 6.0 DETERIORADO

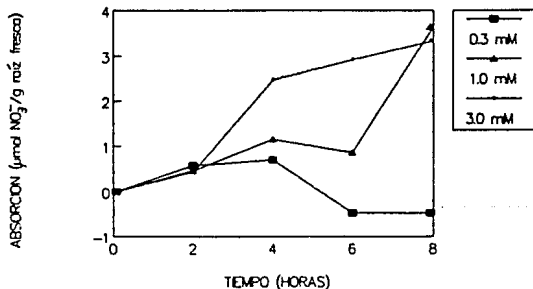


Figura 15.- Absorción de nitratos por las raíces de trigo de los lotes de semilla control y deteriorado cuando se incubaron en soluciones con concentraciones de nitrato entre 0.3 y 3.0 mM y un pH de 6.0. Los puntos de cada curva corresponden a un experimento seleccionado de 9 experimentos independientes.

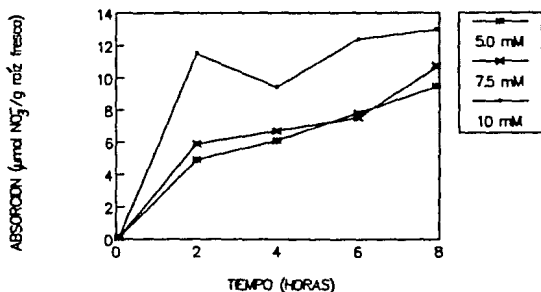
Tabla IV.-Niveles de nitratos absorbidos a 0.3,1.0 y 3.0 mM de nitratos externos.

Concentración (mM NO ₃ ⁻)	Tiempo (Horas)	Absorción(μmol de NO ₃ ⁻ g ⁻¹ peso fresco raíz)	
		Lote	
		Control	Deteriorado
0.3	2	0.15	0.50
	4	0.40	0.70
	6	0.70	- 0.50
	8	0.90	- 0.50
1.0	2	0.60	0.35
	4	1.40	1.15
	6	2.25	0.80
	8	2.95	3.60
3.0	2	1.00	0.50
	4	2.25	2.40
	6	3.10	2.95
	8	3.80	3.35

Todos estos valores fueron determinados con el método del ác. perclórico. El pH del medio fue 6.0.

Ahora bien, examinando las respuestas que tuvieron los lotes control y deteriorado, pero a las concentraciones de 5.0 a 10mM de nitratos(Fig. 16 y Tabla V) el lote control presentó nuevamente la tendencia a absorber el anión en forma proporcional al aumento de la concentración externa del mismo. Por el contrario se detectó que las raíces de las plántulas procedentes de las semillas deterioradas redujeron su absorción neta de nitratos a partir de 5.0mM de nitratos externos, absorbiendo 37% menos y a 7.5mM un 90%

ABSORCION DE NITRATOS pH 6.0 CONTROL



ABSORCION DE NITRATOS pH 6.0 DETERIORADO

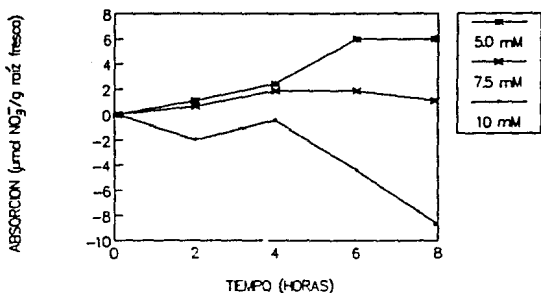


Figura 16.- Absorción de nitratos por las raíces de trigo de los lotes de semilla control y deteriorado cuando se incubaron en soluciones con concentraciones de nitrato entre 5.0 y 10.0 mM y un pH de 6.0. Los puntos de cada curva corresponden a un experimento seleccionado de 8 experimentos independientes.

menos si se compara con las cinéticas presentadas por el lote control en esas mismas concentraciones; al llegar a 10mM se presenta aparentemente una salida neta de los nitratos contenidos en las raíces.

Tabla V.-Niveles de nitratos absorbidos a 5.0,7.5 y 10 mM de nitratos externos.

Concentración (mM NO ₃ ⁻)	Tiempo (Horas)	Absorción(μmol de NO ₃ ⁻ g ⁻¹ peso fresco raíz)	
		Lote	
		Control	Deteriorado
5.0	2	4.75	1.00
	4	6.00	2.40
	6	7.80	6.00
	8	9.50	6.00
7.5	2	5.80	0.65
	4	6.70	1.80
	6	7.50	1.90
	8	10.65	1.05
10.0	2	11.50	-2.00
	4	9.50	-0.55
	6	12.45	-4.45
	8	13.00	-8.65

Todos estos valores fueron determinados con el método del ác. perclórico. El pH del medio fue 6.0.

4.3.1. Determinación de la absorción de nitratos de los lotes experimentales a pH 4.5 y 7.5

En vista de que los resultados anteriores mostraron un efecto nulo del deterioro en la absorción de nitratos a concentraciones externas de 0.3 a 3.0 mM de nitratos, así como también un descenso importante en la toma neta de los mismos por parte del lote deteriorado a concentraciones externas de 5.0 a 10mM, se decidió ahora involucrar al factor pH, ya que se ha reportado en la literatura que un pH ácido externo favorece la entrada de nitratos, en tanto que uno alcalino la dificulta en el caso de especies como la cebada, el trigo y el maíz(19,31,32,35,36,60).

Las curvas de la Fig.17 y Tabla VI resumen los resultados de los ensayos cuando las raíces se sometieron a una concentración de 3.0 mM y a pH 4.5,6.0 y 7.5. A pH 4.5 ambos lotes tuvieron una respuesta positiva ya que aumentaron su absorción neta en un 41% respecto a esa misma concentración a pH 6.0, sin encontrarse diferencias en la absorción entre los dos lotes. A pH 7.5 y 3.0 mM de nitratos, la absorción neta de los mismos fue equivalente a la del final del periodo de absorción a pH 4.5, con la única diferencia de que durante las 3 primeras horas del ensayo, la absorción de los nitratos fue lenta si se compara con las cinéticas de los otros dos pH.

A 7.5 mM de concentración de nitratos(Fig.18 yTablaVII) y un pH de 4.5, el lote control exhibió una absorción neta de nitratos incrementada en un 31% respecto a la obtenida por ese mismo lote pero a un pH de 6.0, por su parte el lote deteriorado también tuvo una absorción de nitratos neta muy superior a la presentada a un pH de 6.0 pues ésta se incrementó en un 91%. Antes de continuar con lo ocurrido en esta misma concentración pero ahora a pH 7.5, debe mencionarse que pese a que el lote deteriorado presentó una absorción neta mejorada, ésta continuó estando por debajo de las cinéticas del lote control. En 7.5 mM de nitratos y pH 7.5, se encontró que el lote deteriorado mejoró en un 85% su absorción de nitratos respecto al pH 6.0, en tanto que el control la disminuyó en 54%, en ambos casos las curvas fueron inferiores a las obtenidas con un pH de 4.5.

ABSORCION DE NITRATOS

a partir de una sol. con 3 mM de NO_3^-

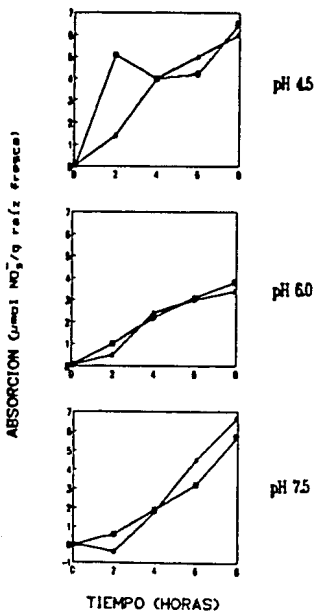


Figura 17.- Absorción de nitratos por raíces de trigo de los lotes de semilla control(■) y deteriorado(△) a 3.0 mM de NO_3^- externos, diferentes tiempos y pH. El conjunto de gráficas muestra el comportamiento de las cinéticas de absorción de nitratos, una vez que las raíces se sometieron a los pHs 4.5, 6.0, 7.5, y 3.0 mM de NO_3^- . Los puntos en cada gráfica corresponden a un experimento seleccionado de 3 experimentos independientes.

Tabla VI.- Absorción de nitratos a partir de una solución con 3 mM de nitratos y pH 4.5, 6.0 y 7.5.

pH	Tiempo (Horas)	Absorción ($\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ peso fresco raíz) Lote	
		Control	Deteriorado
4.5	2	5.10	1.40
	4	3.95	3.95
	6	4.15	6.00
	8	6.50	5.95
6.0	2	1.00	0.50
	4	2.25	2.40
	6	3.10	2.95
	8	3.80	3.35
7.5	2	0.80	-0.40
	4	1.85	1.85
	6	3.20	4.50
	8	5.70	6.65

Valores determinados con el método del ácido perclórico.

ABSORCION DE NITRATOS

a partir de una sol. con 7.5 mM NO_3^-

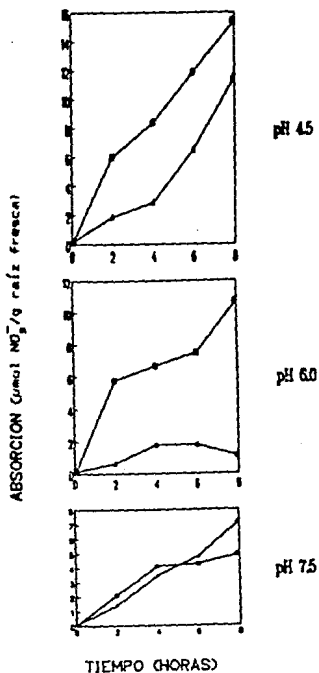


Figura 18.- Absorción de nitratos por raíces de trigo de los lotes de semilla control(●) y deteriorado(■) a 7.5 mM de NO_3^- externos, diferentes tiempos y pH. El conjunto de gráficas muestra el comportamiento de las cinéticas de absorción de nitratos, una vez que las raíces se sometieron a los pHs 4.5, 6.0, 7.5, y 7.5 mM de NO_3^- . Los puntos en cada gráfica corresponden a un experimento seleccionado de 3 experimentos independientes

Tabla VII.- Absorción de nitratos a partir de una solución con 7.5mM de nitratos y pH 4.5, 6.0 y 7.5.

pH	Tiempo (horas)	Absorción ($\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ peso fresco raíz) Lote	
		Control	Deteriorado
4.5	2	6.00	1.90
	4	8.45	2.80
	6	11.85	6.50
	8	15.45	11.50
6.0	2	5.80	0.60
	4	6.70	1.80
	6	7.50	1.90
	8	10.65	1.05
7.5	2	2.10	1.40
	4	4.10	3.35
	6	4.20	4.75
	8	7.15	4.90

Valores determinados con el método del ácido perclórico.

Finalmente a 10 mM (Fig. 10 y Tabla VIII) y pH 4.5 el lote control presentó el nivel más alto de absorción que se encontró en todos estos experimentos (~ 24 μmol de nitratos absorbidos a las 8 horas), en tanto que el lote deteriorado durante las 4 primeras horas tuvo un comportamiento ascendente en su absorción, la cuál fue la mejor de todos los ensayos, sin embargo después de estas cuatro horas se inició un descenso abrupto que culminó con una nula absorción de nitratos a las 8 horas. En 10mM y pH 7.5. la cinética de absorción disminuyó en el lote control en un 53% inicialmente, para al final del periodo de absorción estar un 30%

ABSORCION DE NITRATOS

a partir de una sol. con 10 mM de NO_3^-

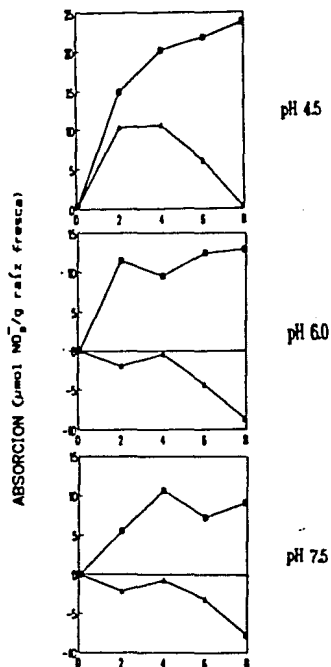


Figura 19.- Absorción de nitratos por raíces de trigo de los lotes de semilla control(■) y deteriorado(▲) a 10 mM de NO_3^- externos, diferentes tiempos y pH. El conjunto de gráficas muestra el comportamiento de las cinéticas de absorción de nitratos, una vez que las raíces se sometieron a los pHs 4.5, 6.0, 7.5, y 10 mM de NO_3^- . Los puntos en cada gráfica corresponden a un experimento seleccionado de 3 experimentos independientes.

por debajo de la curva generada en esta misma concentración pero a pH 6.0. En lo que toca al lote deteriorado, este presentó el mismo comportamiento ocurrido en el caso cuando se tuvo en el medio 10 mM de nitratos y un pH de 6.0.

Tabla VIII.- Absorción de nitratos a partir de una solución con 10.0mM de nitratos y pH 4.5, 6.0 y 7.5.

pH	Tiempo (horas)	Absorción($\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ peso fresco raíz) Lote	
		Control	Deteriorado
4.5	2	14.90	10.30
	4	20.20	10.65
	6	21.85	6.10
	8	23.75	0.0
6.0	2	11.50	-2.00
	4	9.50	-0.55
	6	12.45	-4.45
	8	13.00	-8.65
7.5	2	5.50	-2.20
	4	10.65	-0.75
	6	7.20	-3.15
	8	9.10	-7.80

Valores determinados con el método del ácido perclórico.

4.3.2 Determinación de la absorción de nitratos de los lotes experimentales con los métodos de brucina y ác. salicílico

El comportamiento de la absorción de nitratos por el lote control descrito en los datos anteriores, se halló muy similar en magnitudes al reportado en otros sistemas(29,30,31,34,35), sin embargo no existen en la literatura datos sobre plántulas de

semillas deterioradas, por lo que se procedió a verificar que la expulsión neta ante 10mM de nitratos exógenos observada en las gráficas del lote deteriorado a pH de 6.0 y 7.5(Figs.18,19), no fuera un artificio provocado por alguna sustancia(s) que estuviera interfiriendo con la determinación de nitratos por el método a base de ácido perclórico, que fue el que se estuvo manejando hasta ese momento.

Para lograr esto, primero se procedió a comparar tres métodos de cuantificación de nitratos y a determinar la cantidad de nitratos presentes en las raíces no expuestas a estos iones.

Los otros dos métodos que se usaron fueron el de la brucina y el del ácido salicílico. Los resultados de esta determinación pueden apreciarse en la Tabla IX, estos datos fueron procesados por medio de un Análisis de Varianza($p < 0.05$), observándose que los valores obtenidos por los métodos del ácido salicílico y brucina no presentaron diferencias significativas entre sí, en tanto que con el método del ácido perclórico, las cantidades obtenidas fueron 5 veces mayores que las reportadas por los otros dos métodos. Sin embargo por los tres métodos no existen diferencias significativas entre las cantidades de nitratos existentes en ambos lotes de raíces.

Tabla IX.- Niveles de nitratos iniciales en las raíces.

Se indican los niveles de nitratos iniciales en el tejido radicular de los lotes control y deteriorado determinados por tres métodos.

Lote	Método	Contenido de nitratos ($\mu\text{mol NO}_3^-/\text{g}$ de peso fresco de raíz)		
		Ac. Salicílico	Brucina	Ac. Perclórico
Control		3.60 \pm 0.69	4.28 \pm 0.24	21.57 \pm 0.012
Deteriorado		3.21 \pm 0.38	5.21 \pm 1.32	22.63 \pm 0.016

Cada valor es la media \pm desviación estándar (n=3)

Estos resultados indicaron que la cantidad máxima de nitratos que podían expulsarse al medio externo de acuerdo a la técnica del ácido perclórico era alrededor de $22\mu\text{mol/g}$ de raíz fresca, cantidad de nitratos consistente con las $8\mu\text{mol/g}$ de raíz expulsadas al medio al final de los ensayos con 10mM de nitratos y pH 6.0 y 7.5 por el lote deteriorado. No obstante, como se mencionó anteriormente, se ha reportado en algunos casos la salida de una sustancia junto con los nitratos que absorbe a 210nm ($32,58$) por lo que decidimos asegurarnos de que en nuestras determinaciones con ácido perclórico no hubiera existido una fuente de interferencia que pudiera provenir de algún reactivo mezclado en la solución, para el ensayo de absorción de nitratos ó que alguna sustancia(s) de naturaleza desconocida estuviera saliendo de las raíces al medio e interfiriera en las determinaciones.

Explorando la primera posibilidad, en la Tabla X, se muestran los resultados que se obtuvieron al determinar la cantidad de nitratos presentes en una alícuota de una solución para ensayo con 10mM de nitratos y 0.25mM de Mes/KOH pH 6.0. Al comparar los resultados entre sí por medio del Análisis de Varianza no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla X.- Determinación de nitratos en alícuotas de una solución de nitratos por 3 métodos. La solución contenía 5mM KNO_3 , 2.5mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.25mM Mes/KOH pH 6.0 y $0.5\mu\text{M}$ de Na_2MoO_4 ; la cantidad de nitratos totales fue de $14.2\mu\text{g}$

Método	Cantidad de nitratos (μg)
Ac. Salicílico	15.15 ± 0.17
Brucina	14.48 ± 0.32
Ac. Perclórico	15.07 ± 0.17

Los valores son la media \pm desviación estándar ($n=3$)

Con los resultados de la Tabla X era lógico suponer que en caso

Estos resultados indicaron que la cantidad máxima de nitratos que podían expulsarse al medio externo de acuerdo a la técnica del ácido perclórico era alrededor de $22\mu\text{mol/g}$ de raíz fresca, cantidad de nitratos consistente con las $8\mu\text{mol/g}$ de raíz expulsadas al medio al final de los ensayos con 10mM de nitratos y pH 6.0 y 7.5 por el lote deteriorado. No obstante, como se mencionó anteriormente, se ha reportado en algunos casos la salida de una sustancia junto con los nitratos que absorbe a 210nm (32.58) por lo que decidimos asegurarnos de que en nuestras determinaciones con ácido perclórico no hubiera existido una fuente de interferencia que pudiera provenir de algún reactivo mezclado en la solución, para el ensayo de absorción de nitratos ó que alguna sustancia(s) de naturaleza desconocida estuviera saliendo de las raíces al medio e interfiriera en las determinaciones.

Explorando la primera posibilidad, en la Tabla X, se muestran los resultados que se obtuvieron al determinar la cantidad de nitratos presentes en una alícuota de una solución para ensayo con 10mM de nitratos y 0.25mM de Mes/KOH pH 6.0. Al comparar los resultados entre sí por medio del Análisis de Varianza no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla X.- Determinación de nitratos en alícuotas de una solución de nitratos por 3 métodos. La solución contenía 5mM KNO_3 , 2.5mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.25mM Mes/KOH pH 6.0 y $0.5\mu\text{M}$ de Na_2MoO_4 ; la cantidad de nitratos totales fue de $14.2\mu\text{g}$

Método	Cantidad de nitratos (μg)
Ac. Salicílico	15.15 ± 0.17
Brucina	14.48 ± 0.32
Ac. Perclórico	15.07 ± 0.17

Los valores son la media \pm desviación estándar (ns)

Con los resultados de la Tabla X era lógico suponer que en caso

de existir una interferencia con las determinaciones, ésta tendría que provenir de alguna sustancia(s) "X" la cuál era vertida al medio externo durante el ensayo, por lo que se optó por llevar a cabo un ensayo de absorción de nitratos con una solución 10mM de nitratos y pH 6.0, monitorear a los tiempos 6 y 8 horas (que eran los tiempos en donde mayor "salida" de nitratos indicaban los experimentos previos (ver Fig.19)) y determinar nitratos en las alícuotas por los tres distintos métodos.

En la Tabla XI se resumen los datos por duplicado que se obtuvieron del ensayo antes descrito. Se encontró que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tres métodos en los casos 6 horas (control y deteriorado) así como también en el caso 8 horas control. Los datos del caso 8 horas del lote deteriorado sí presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los métodos, resultando el método del ác. perclórico con cifras negativas comparadas con las de los otros dos métodos. No obstante, con las tres técnicas se obtuvieron valores menores de nitratos absorbidos a las 8 horas comparadas con las de las 6 horas, lo cuál sugiere una disminución en la capacidad de absorber nitratos por el lote deteriorado.

Tabla XI. - Determinación por 3 métodos de los niveles de nitratos absorbidos a 2 tiempos.

Método	Lote	Absorción de nitratos ($\mu\text{mol NO}_3 \text{g}^{-1}$ peso fresco raíz)			
		6 horas		8 horas	
		Control	Deteriorado	Control	Deteriorado
Ac. Perclórico		10.82 \pm 1.43	4.81 \pm 1.34	14.60 \pm 0.46	-3.02 \pm 0.10
		11.15 \pm 0.66	4.26 \pm 0.60	14.88 \pm 0.0	-3.12 \pm 0.11
Ac. Salicílico		8.08 \pm 0.0	S.D.	10.51 \pm 2.14	S.D.
		8.06 \pm 0.24	5.64 \pm 0.64	7.85 \pm 0.85	0.40 \pm 1.07
Brucina		5.20 \pm 0.96	7.92 \pm 0.32	6.33 \pm 5.76	0.45 \pm 0.0
		15.0 \pm 0.0	7.08 \pm 0.59	20.03 \pm 0.0	0.27 \pm 1.05

Los valores reportados para cada método corresponden a dos determinaciones independientes de la misma muestra-desviación están

dar(n=3). S.D. Sin determinar

La discordancia entre los valores de absorción de nitratos obtenida por la técnica del ácido perclórico y las otras dos a la concentración de 10mM de nitratos exógenos y tiempo 8 horas, indicaba claramente que éste tiempo y concentración de nitratos exógenos podía causar un daño en la permeabilidad de los tejidos radiculares del lote deteriorado, lo que podría permitir la salida de un(los) compuesto(s) que interfirieran con las determinaciones a base de ácido perclórico.

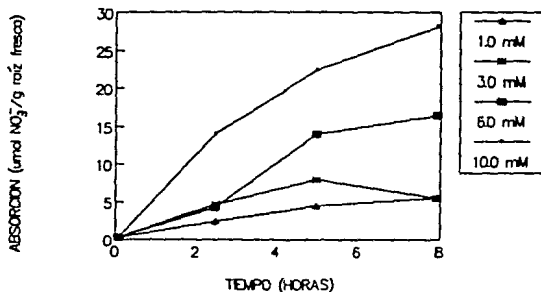
En vista de que el método empleado en las determinaciones de absorción de nitratos(ác. perclórico), resultó ser sensible a alguna(s) sustancia(s) excretadas no identificada(s), se decidió llevar a cabo otros ensayos de absorción para determinar los nitratos ahora con el método del ácido salicílico, ya que fué el segundo en orden de facilidad y seguridad en el trabajo, así como también el que menos interferencias reportaba(39). Las concentraciones que se seleccionaron para llevar a cabo este propósito fueron :1.0, 3.0, 6.0 y 10mM, por ser las más representativas de los conjuntos de curvas encontradas en un principio.

En la Fig. 20 y Tabla XII, se presentan los datos de este experimento.

En el lote control a 1.0 y 3.0mM de nitratos en el medio, se encontró con el método del ácido salicílico un incremento en la absorción de nitratos, dependiente del aumento en la concentración del nitrato exógeno y del tiempo de absorción. Esto mismo se había encontrado en el experimento análogo en donde la determinación de nitratos se había llevado a cabo con el método del ácido perclórico. Sin embargo, la magnitud de los valores del nitrato absorbido en éste último experimento, parece ser ligeramente mayor comparada con la de los obtenidos por el método del ácido perclórico.

En las curvas de absorción de nitratos por el lote control a 6.0 y 10mM de nitratos exógenos, el patrón encontrado fue también similar aunque incrementado en magnitud al obtenido con el método

ABSORCION DE NITRATOS pH 6.0 CONTROL



ABSORCION DE NITRATOS pH 6.0 DETERIORADO

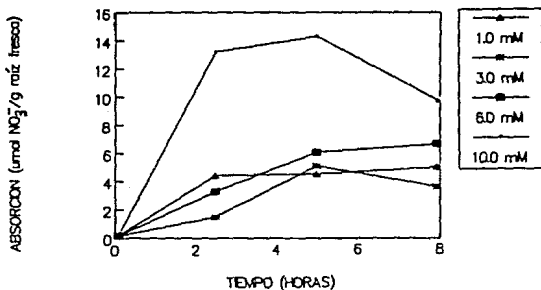


Figura 20.- Absorción de nitratos por las raíces de trigo de los lotes de semilla control y deteriorado cuando se incubaron en soluciones con concentraciones de nitratos 1.0, 3.0, 5.0 y 10 mM y un pH de 6.0, determinadas con el método del ácido salicílico. Los puntos de cada curva corresponden a un experimento seleccionado de cuatro experimentos independientes.

Tabla XII.- Niveles de nitratos absorbidos a concentraciones externas de 1.0, 3.0, 6.0 y 10mM de nitratos.

Concentración ($\mu\text{mol NO}_3^-$)	Tiempo (Horas)	Absorción($\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ peso fresco raíz) Lote	
		Control	Deteriorado
1.0	2.5	2.45	4.45
	5.0	4.50	4.60
	8.0	5.60	5.00
3.0	2.5	4.70	1.50
	5.0	8.00	5.15
	8.0	5.50	3.65
6.0	2.5	4.50	3.30
	5.0	14.05	6.10
	8.0	16.50	6.70
10.0	2.5	14.10	13.20
	5.0	22.40	14.30
	8.0	28.20	9.70

Valores determinados con el método del ác. salicílico.

del ácido perclórico.

Por su parte el lote deteriorado a 1.0 y 3.0mM de nitratos en el medio, presentó también un aumento en la absorción de nitratos dependiente del incremento en concentración de los mismos y del tiempo de absorción. Este comportamiento es equivalente al hallado en el experimento correspondiente a estas concentraciones pero determinado por medio del método con ácido perclórico. En lo referente a las magnitudes, se determinó que por ambos métodos colorimétricos fueron similares.

La absorción del lote deteriorado ante 6.0 y 10mM de nitratos externos, se encontró nuevamente incrementada dependiendo del tiempo y de la concentración. No obstante a las 8 horas con 10mM de nitratos en el medio se hizo evidente un descenso en la absorción del anión.

Esta cinética de absorción de nitratos observada con 6.0mM de nitratos y estimada con el ácido salicílico, fue congruente con la observada a 5.0mM y determinada con el ácido perclórico, en tanto que a 10mM los valores fueron distintos a los determinados por el método del ácido perclórico, en donde se observó una salida neta de nitratos.

Finalmente al comparar las curvas de absorción de nitratos de los lotes control y deteriorado determinadas con la técnica del ácido salicílico, se aprecia que a concentraciones de 1.0 y 3.0mM de nitratos en el medio, prácticamente ambos lotes de raíces absorbieron nitratos con la misma velocidad y cantidad. Por otra parte a 6.0 y 10mM de nitratos exógenos el lote control absorbió el doble de los mismos en comparación con el lote deteriorado, e inclusive a un tiempo de 8 horas y 10mM de nitratos externos, existió una expulsión de los nitratos en el lote deteriorado.

Es conveniente recalcar que a pesar de la diferencia en magnitudes en el nitrato absorbido por los dos lotes (deteriorado y control) según los dos diferentes métodos, persiste una diferencia entre el grupo control y el deteriorado estando disminuidos los valores de nitratos absorbidos del grupo deteriorado con respecto al control a concentraciones de nitratos exógenas entre 6 y 10mM.

D
I
S
C
U
S
I
O
N

DISCUSION

Las semillas sometidas al deterioro presentaron un retraso significativo ($p < 0.05$) de su velocidad de germinación respecto a las del lote control. este retraso se mantuvo durante toda la experimentación siendo más evidente la diferencia durante los tres primeros días de germinación (Fig. 11).

Con esto se determinó que la viabilidad fue afectada por el deterioro de una manera moderada (el porcentaje de germinación disminuyó solamente del 99% al 95%).

En cuanto al parámetro de velocidad de crecimiento (Tabla III) de cada una de las partes que conforman a la plántula, éstas se vieron afectadas en el lote deteriorado de diferente manera; en el caso de la raíz, se presentó una reducción significativa del crecimiento ($p < 0.05$) con respecto al lote control (Fig. 12), del mismo modo pero ahora en el caso del endospermo, el consumo de los materiales de reserva contenidos en él fue mucho más lento en el lote deteriorado (Fig. 13). Los coleóptilos por su parte (Fig. 14), no presentaron diferencias significativas entre los dos lotes en sus tasas de crecimiento.

Estas características denotan que en el lote de semillas deterioradas el desarrollo de las primeras etapas de la germinación fueron afectadas negativamente por un lado, y por otro que el desarrollo de sus plántulas se alteró en lo concerniente al incremento en biomasa del tejido radicular así como en el consumo de las sustancias de reserva; de esto se desprende que el vigor de las semillas deterioradas se vió reducido como consecuencia del tratamiento de deterioro.

Toda esta serie de eventos fisiológicos alterados a consecuencia de un deterioro suave, nos sugieren que el lote de

semillas deterioradas pudo sufrir las cuatro primeras fases de la serie de sucesos fisiológicos y bioquímicos propuestos por Heydecker(8) que son: a) La degradación de membranas celulares y una subsecuente pérdida del control de la permeabilidad, b) El deterioro del sistema energético y de los mecanismos biosintéticos, c) Una reducción de la respiración y biosíntesis y d) Disminución del vigor y viabilidad de las semillas. En virtud de que el mecanismo de absorción de nitratos está involucrado en los eventos descritos en los incisos a) y b) pensamos que nuestras condiciones de deterioro fueron las adecuadas para llevar a cabo nuestro estudio.

Dado que para la realización de los ensayos de absorción de nitratos se requerían de 3g de tejido radicular fresco como cantidad mínima, así como también de que las raíces de ambos lotes de semillas tuvieran en el día del ensayo el mismo estadio de desarrollo, se determinó a partir de los datos de la Fig. 12 que los días de cosecha fueran, 4 para el control y 5 para el deteriorado.

Para llevar a cabo el estudio de la absorción de nitratos en el lote deteriorado y control, se optó por hacerlo a concentraciones de nitratos "bajas"(0.3 a 3.0 mM de nitratos) y "altas"(5 a 10 mM de nitratos), determinadas previamente en experimentos preliminares y a pH de 6.0. Este pH se escogió por ser el que en la literatura se reporta como óptimo para la realización de este tipo de estudios.

La Fig. 15 y Tabla IV que corresponden a las cinéticas de absorción de nitratos ante "bajas" concentraciones de los mismos en el medio y que fueron determinadas con el método del ác. perclórico, indicaba que ambos lotes de raíces incrementaban su absorción de nitratos dependiendo de la concentración y del tiempo e inclusive las absorciones que alcanzan ambos lotes eran muy parecidas, aún cuando exista cierta dispersión en el lote deteriorado.

Al someter estos lotes de raíces a concentraciones "altas"(5-10 mM de nitratos)(Fig. 18 y Tabla V), el lote control mantenía el

mismo comportamiento que a "bajas" concentraciones, mientras que el lote deteriorado a partir de 5.0 mM parecía absorber menos nitratos en relación a la cinética obtenida a esta misma concentración en el lote control. En 7.5 mM se incrementaba la diferencia, observándose finalmente que a 10mM de nitratos externos el lote deteriorado no absorbía en ningún momento nitratos, y por el contrario parecía expulsar los endógenos en forma continua.

Las lecturas procedentes de los ensayos de absorción con 10mM de nitratos y pH 8.0 y 7.5, determinadas colorimétricamente por medio del método del ácido perclórico, en el lote deteriorado resultaba difícil de explicar por qué desde el inicio del ensayo se presentaba una salida neta de los nitratos internos y que se mantenía a lo largo del experimento, ya que otros reportes indicaban que una expulsión de nitratos toma generalmente tiempos más largos(19,26,27,29,30,36,45,47,49,58). Sin embargo estos reportes han sido en plantas cuyas semillas no han sido deterioradas. El otro punto por aclarar era si en realidad esta salida de nitratos era tal, y no obedecía a un artefacto en la determinación química de los nitratos.

Con el fin de evitar la posibilidad de haber sobrestimado la cantidad de nitratos vertida al medio, provocada por algún tipo de interferencia, se optó por determinar nitratos en diferentes tipos de muestras utilizando los métodos del ácido salicílico, brucina y ác. perclórico para efectos comparativos.

Cuando determinamos nitratos en extractos totales de raíces de trigo de los lotes deteriorado y control(Tabla IX), encontramos que el método del ácido perclórico producía lecturas muy altas comparadas a las de los otros dos métodos, sin embargo las diferencias entre los lotes control y deteriorado eran estimadas correctamente. Por lo cuál este método nos estaría dando magnitudes diferentes, pero podría estimarnos de manera confiable las diferencias entre los lotes control y deteriorado. La razón por la cuál, este método proporcionó números sobrestimados de nitratos podría ser que en este caso las muestras fueran extractos

totales de raíz, lo cual puede llevar a la solubilización de muchos compuestos que absorben como el ión nitrato.

Cuando las muestras procesadas por los tres métodos fueron estándares de nitrato (Tabla X), no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las cantidades reportadas por los tres métodos, con lo que se descartó la posibilidad de que los reactivos de la solución empleada para los ensayos interfirieran en la determinación colorimétrica. Más adelante se realizó un ensayo de absorción de nitratos con una solución con 10mM y pH 6.0, monitoreando a las 6 y 8 horas, para luego determinar las alícuotas por los tres métodos (Tabla XI).

Al comparar estadísticamente las lecturas obtenidas por los tres métodos (Tabla XI), se encontró que no existían diferencias significativas en las cifras de las columnas CONTROL (6hr y 8hr) y DETERIORADO (6hr). En el caso de las lecturas de la columna DETERIORADO (8hr) sí existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las lecturas de los tres métodos, siendo las del método con ác. perclórico las que diferían con las de los otros dos métodos, lo cual indicó que éste último método (ác. perclórico) era sensible a algún compuesto que podría estar liberándose al medio por las raíces del lote deteriorado a tiempos largos y a altas concentraciones de nitratos exógenos.

Finalmente para verificar que los resultados de las determinaciones que ya se habían realizado con el ác. perclórico fueran los mismos sin importar el método para determinar al anión, se decidió repetir las cinéticas de absorción en medios con 1,3,6 y 10mM de nitratos a pH 6.0 (Fig. 20 y Tabla XII) usando ahora el método del ác. salicílico. Al comparar las cinéticas de absorción obtenidas con el ác. perclórico con su correspondiente de ác. salicílico, se encontró que a 1 y 3mM de nitratos externos (concentraciones "bajas") ambos lotes de raíces aumentaban su absorción dependiendo del tiempo y de la concentración, además de que no hubo diferencias en sus comportamientos. Tal patrón es consistente con lo obtenido anteriormente con el método del ácido perclórico. A concentraciones de 6 y 10mM (concentraciones "altas") el lote control presentó la misma tendencia que a bajas

concentraciones, lo cual también se había encontrado con el ensayo del ácido perclórico, en tanto que el lote deteriorado absorbió menos nitratos en comparación con los niveles del lote control. A 10mM llamo la atención el hecho de que el lote deteriorado sí absorbió nitratos al inicio del ensayo, aunque al final comenzó a expulsarlos.

Las discrepancias entre las magnitudes de los resultados obtenidos por estos dos métodos, pueden deberse a que sustancias desconocidas sean vertidas por las raíces al medio externo y que se encuentren interfiriendo con el ensayo de detección de nitratos. Al respecto Doddema y Telkamp(32) y Jackson(58) reportan que una sustancia de naturaleza desconocida puede ser expulsada por las raíces bajo ciertas condiciones y que esta sustancia absorbe a 210 nm. Tomando en consideración el rango de absorción de esta sustancia, es factible que tanto el método del ácido perclórico, así como el del ácido salicílico puedan tener este tipo de interferencia, no obstante, las técnicas del ácido salicílico y de la brucina cuantificaron los mismos niveles de nitratos en las diferentes condiciones, por lo cual estas dos técnicas son las más confiables.

Las tendencias determinadas por ambos métodos colorimétricos(ác. perclórico y ácido salicílico) coincidieron en señalar que, ante bajas concentraciones de nitratos(0.3 a 3.0mM) el lote de raíces provenientes de semillas deterioradas presentó un comportamiento similar al del lote control, en tanto que a altas concentraciones(5.0 a 10mM) la absorción fue deficiente en el lote deteriorado.

Estos resultados pueden interpretarse de varias maneras. Existen suficientes pruebas por las cuales muchos investigadores proponen la existencia de dos sistemas involucrados en el mecanismo de absorción de nitratos en las plantas superiores(19,20,30,31,32,35,36,58), estos mismos autores mencionan que uno de los sistemas(sistema constitutivo) funciona a concentraciones bajas y el otro(sistema II), lo hace a concentraciones altas, además de que este último es sintetizado de *newe* una vez que la raíz tiene contacto con los nitratos que la

circundan. Tomando en consideración estos hechos parece factible que el sistema I ó 'constitutivo', encargado de transportar los nitratos ante "bajas" concentraciones de los mismos, no haya sido afectado a consecuencia del deterioro como lo muestran las curvas generadas a concentraciones de 0.3 a 3.0mM (bajas concentraciones) de nitratos (Fig. 15).

En contraparte, el encontrar una explicación satisfactoria a los fenómenos de disminución de absorción a partir de 5.0 mM en el lote deteriorado, así como también la salida neta de los mismos a 10mM, es más complejo ya que cabe la posibilidad de que sean varios los componentes afectados por el deterioro. Algunas de las posibles explicaciones pudiesen ser las siguientes:

a) Una vez que el nitrato hubiera entrado a la célula e indujera la síntesis *de novo* del sistema transportador II, cabría la posibilidad de que su síntesis ó inserción en la membrana plasmática no se llevase a cabo adecuadamente y por lo tanto no funcionara óptimamente. La exploración de esta posibilidad podría llevarse a cabo siguiendo la síntesis del transportador (se ha reportado que el peso molecular de esta proteína es de alrededor de 47Kd) por medio de técnicas de electroforesis.

b) Otra probable explicación pudiera ser que las membranas plasmáticas se hallen permeabilizadas y por lo tanto los nitratos salgan en mayor cantidad a medida que aumenta la concentración de nitratos presentes en el medio. Para comprobar esta posibilidad, podrían hacerse pruebas con algún tipo de colorante (p.e. azul tripano), el cuál tiene la propiedad de atravesar las membranas plasmáticas que estén permeabilizadas, por lo que si éste fuera el caso, las células de las raíces deterioradas se teñirían con el colorante.

c) Por último debe recordarse que el mecanismo de absorción de nitratos una vez que los dos sistemas de transporte trabajan a su máxima capacidad, se encuentra regulado por una entrada y salida de nitratos, proponiéndose además que esta entrada y salida dependen de la concentración del anión que se alcanza en el citosol. Además, la acumulación de nitratos en las plántulas de semillas deterioradas esta disminuída en comparación al lote

control así como también la actividad de la NRAC (Nitrato-reductasa) (17). Entonces sería factible pensar que durante la exposición a altas concentraciones de nitratos las raíces deterioradas aumentarían su concentración de nitratos en el citosol, y si estos no pudieran reducirse a velocidades normales por la NRA o no pudieran almacenarse adecuadamente, saldrían en una relación mayor a su entrada.

El efecto producido por el pH ácido en el medio, fue el de incrementar la absorción de nitratos en el lote de raíces control, en tanto que el pH alcalino produjo un decremento, efectos que coincidieron con lo reportado en la literatura (25,31,60). Por su parte el lote deteriorado no compartió este mismo comportamiento en su totalidad ya que por ejemplo, cuando se sometieron las raíces a pH 7.5 y una concentración de nitratos de 7.5 mM en vez de disminuir su absorción de nitratos con respecto a la de los pH ácidos, ésta se vio incrementada (Fig. 18).

Los resultados obtenidos para el lote control vienen a apoyar las propuestas que existen en cuanto a la existencia de un transporte de nitratos de tipo de simporte $\text{NO}_3^-; 2\text{H}^+$, ya que a mayor concentración de protones se facilitó la entrada de nitratos, en este sentido los iones OH^- (a pH básico) interfieren negativamente por el sitio de absorción de nitratos (19).

Cuando se habla de gradientes de protones, debe recordarse que las enzimas involucradas en el mantenimiento de este gradiente en el medio extracelular son las ATPasas de H^+ de la membrana plasmática (59). Estas enzimas como se mencionó con anterioridad han sido relacionadas íntimamente con el mecanismo de absorción de nitratos (Mc Clure et al (36) observaron que al inhibir la actividad de la ATPasa- H^+ de la membrana plasmática, la absorción de nitratos en raíces de maíz cesaba). Estos hechos aunados a los resultados que se obtuvieron al variar el pH en el lote deteriorado, pudieran estar evidenciando también una producción insuficiente de un gradiente de protones a consecuencia de una ineficiente producción de ATPasas- H^+ de membrana plasmática, a un inadecuado funcionamiento de las existentes o bien a un aumento a

la permeabilidad inespecífica de la membrana. Con el uso de técnicas de biosíntesis de proteínas, podría investigarse si la cantidad de ATPasas de H^+ está disminuída en el lote deteriorado, y por medio de ensayos *in vitro* con la enzima incluída en microsomas obtenidos de las raíces de los lotes en cuestión, podría verificarse la actividad de estas ATPasas de H^+ .

Un efecto interesante del pH sobre la aparente expulsión de nitratos es que a pH ácido(4.5), no hay un eflujo del anión, mientras que un aumento en el pH(6.0 ó 7.5) lo favorece. La explicación a ésto pudiera ser fisiológica y sería que un pH ácido permita una mayor entrada de nitratos, y con ello la salida se vea minimizada, o bien que el daño fisiológico de la raíz del lote deteriorado se exprese menos. También es probable que la(s) sustancia(s) que se libera de la raíz y que es(son) detectada(s) como nitratos cambie sus propiedades espectroscópicas según el pH.

A lo largo del desarrollo de este trabajo, se hicieron evidentes algunas de las consecuencias que trae consigo el deterioro de semillas durante el almacenamiento, estos efectos fueron, una disminución en: 1) El porcentaje de germinación, 2) La velocidad de germinación, 3) Las velocidades de crecimiento de las raíces y del consumo de los materiales de reserva del endospermo. Aunado a ésto, la disminución en la absorción de nitratos por las raíces del lote deteriorado, dificulta el pronto establecimiento de la planta como organismo autotrófico.

Este conjunto de consecuencias pueden incidir a largo plazo en la producción de granos y semillas, ya que el éxito en la agricultura depende entre otros factores de disponer de lotes de semilla de alta calidad, de las cuales emerjan rápida y homogéneamente las plántulas, evitándose con ello que los patógenos del suelo lleguen a infectar a la semilla.

Respecto al uso de fertilizantes en los campos de cultivo, no obstante que los ensayos llevados a cabo fueron *in vitro*, se recomienda tener moderación en su aplicación ya que si a 10 mM de nitratos externos se detectó una expulsión de nitratos en las raíces del lote deteriorado, si llegaran a usarse semillas

ligeramente deterioradas (como fue este el caso) y una alta concentración de nitratos (se sabe que la concentración de nitratos en los suelos agrícolas mexicanos es excesivamente alta en relación a los de los países que son grandes exportadores de trigo, (véase Figs. 5 y 6) se producirían deficiencias ó aún un nulo crecimiento de las plántulas, desperdiciándose así recursos en cultivos cuya producción no será la esperada.

Esta tesis da pauta a que se realicen más investigaciones para conocer específicamente cuáles de los componentes del mecanismo de transporte de nitratos fueron afectados durante el deterioro, siendo algunos probables sujetos de estudio las ATPasas- H^+ de la membrana plasmática y de tonoplasto, las cinéticas de los sistemas transportadores de nitratos I y II en vesículas de membrana plasmática, usando para ello como técnica de medición de nitratos los electrodos, HPLC ó isótopos, la identificación de la sustancia(s) que estuvo interfiriendo en las determinaciones de absorción, entre otros.

Para finalizar debo mencionar que la serie de investigaciones sugeridas anteriormente, deben encaminarse a despejar la incógnita de qué es lo que aconteció durante el deterioro de la semilla que dió por consecuencia una plántula deficiente en la absorción de nitratos por sus raíces. En este sentido opino que el DNA contenido en las células del meristemo radicular de la semilla sufrió algún tipo de alteración que persistió hasta las células de la raíz, produciéndose a consecuencia de ello, disfunciones en moléculas relacionadas con la absorción de nitratos como pudieran ser ATPasas- H^+ de membrana plasmática y de tonoplasto, lipasas (causantes del deterioro de las membranas plasmática y de tonoplasto), acarreadores de nitratos, etc.

C
O
N
C
L
U
S
I
O
N
E
S

CONCLUSIONES :

a) Los parámetros velocidad de germinación y crecimiento fueron afectados negativamente en las semillas sometidas al deterioro, si bien éste fue un deterioro moderado.

b) Las cinéticas de absorción de nitratos no difieren significativamente entre los lotes control y deteriorado cuando las concentraciones externas de nitratos están entre 0.3 y 3.0mM.

c) A concentraciones externas de nitratos entre 5 y 10mM las cinéticas de absorción difieren significativamente siendo el lote deteriorado el que presenta una absorción disminuida.

d) Lo anterior podría explicar la disminución de la acumulación de nitratos en plántulas de semillas de trigo deterioradas reportada por Padilla(17).

e) El pH ácido favoreció la entrada de nitratos en los dos lotes de raíces independientemente de la concentración de nitratos externa.

f) Los métodos de determinación de nitratos con ác. perclórico y ác. salicílico detectaron, que las raíces del lote deteriorado al contacto con un medio de alta concentración de nitratos y/o pH alcalino, absorben nitratos en niveles muy inferiores a los del lote control. Además de que el método con ác. perclórico reveló la presencia de alguna sustancia(s) no identificada que probablemente es expulsada por las raíces del lote deteriorado a tiempos largos y ante altas concentraciones de nitratos exógenos.

g) La deficiencia en la absorción de nitratos en las raíces del lote deteriorado puede estar causada por un daño al acarreador del anión, a las ATPasas de H^+ de la membrana plasmática y del tonoplasto, y/o a la permeabilidad de la membrana plasmática. No se descarta que la membrana del tonoplasto también se encuentre afectada de manera análoga. Lo más plausible que estas alteraciones tengan origen en el DNA de los sistemas correspondientes y que pudo ser afectado en las células presentes en la semilla durante el deterioro.

B
I
B
L
I
O
G
R
A
F
I
A

LITERATURA CITADA

1. Moreno, M.E. (1978). Los problemas de la conservación de granos y semillas en México. Ciencia y desarrollo. 3:9-17.
2. Ruiz-Orozcos, M., Nieto, R.D. y Laríos, R.I. (1983). Tratado elemental de Botánica. ECLALSA. México, D.F. pp 730.
3. Cronquist, A. (1984). Introducción a la Botánica. CECSA México, D.F. pp 800.
4. Bewley, J.D. and Black, M. (1978). Physiology and Biochemical of seeds in relation to germination. Springer-Verlag. Berlin, Germany. pp 304.
5. Kermode, A.R. (1990). Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. Critical Reviews in Plant Sciences. 9:155-195.
6. Heydecker, W. (1972). Vigour. In : Roberts, E.H. (1972). Viability of seeds. Syracuse University Press. USA. pp 209-247.
7. Isely, D. (1957). Vigor tests. Proc. Assoc. off. Seed Anal. 47:176-182.
8. Ader, F. (1965). Zur definition eines einheitlich anwendbaren Begriffs der Triebkraft. Proc. int. Seed Test. Ass. 30:1005-1012.
9. Neeb, O. (1970). Keimfähigkeit, Triebkraft und Feldaufgang bei Zuckerrubensaargut. In : Ader, F. (ed) (1969). Hundert Jahre Saatgutprüfung (1869-1969). Sauerländer, Frankfurt am Main. pp 76-82.
10. Germ, H. (1960). Methodology of the vigour test for wheat, rye and barley in rolled filter paper. Proc. int. Seed Test. Ass. 25: 515-518.
11. Moreno, M.E. (1984). Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. UNAH pp

350.

12. Abdul-Baki, A. and Anderson, D.(1971). Physiological and biochemical deterioration of seeds. In : Kozlowski, T.T.(1972). Seed biology. Academic Press. New York. USA. II : 283-300.
13. Agrics, G.N.(1985). Fitopatología. Limusa. México. D.F. pp 758.
14. Roberts, E.H.(1972). Loss of viability and crop yields. In : Roberts, E.H.(1972). Viability of seeds. Syracuse University Press. USA. pp 307-320.
15. Throneberry, G.O. and Smith, F. G.(1955). Relation of respiratory and enzymatic activity to corn seed viability. Plant Physiol. 30: 307.
16. Woodstock, L. W. and Grabe, D. F.(1967). Relationships between seed respiration during imbibition and subsequent seedling growth in *Zea mays* L. Plant Physiol. 42: 1071.
17. Padilla, M.T.I.(1985). Participación de la nitrato-reductasa en la expresión del vigor de plántulas de trigo. Tesis de Licenciatura en Química. Facultad de Química UNAM (México) D.F. pp 110.
18. Brown, T. y Lemay, E.H.(1985). Química la ciencia central. Prentice Hall. México pp 893.
19. Glass, A.D.M.(1988). Nitrogen uptake by plant roots. Atlas Sci Anim Plant Sci. 1 : 151-158.
20. Lehninger, A.L.(1980). Bioquímica. Omega. S.A. Barcelona, España. pp 1117.
21. Delwiche, C.C.(1983). Cycling of elements in the Biosphere. In : Läuchli, A. and Bielecki, R.L.(eds)(1983). Encyclopedia of Plant Physiology. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 15A : 219-225.
22. Beevers, L.(1976). Nitrogen metabolism in plants. E. Arnold London. England. pp 333.
23. Beevers, L. and Hageman, R.H.(1983). Uptake and reduction of nitrate: Bacteria and higher plants. In: Läuchli, A. and Bielecki, R.L.(eds)(1983). Encyclopedia of Plant Physiology. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 15A : 350-355.

24. Gutschick, V. P. Energy flows in the nitrogen cycle, especially in fixations. In: Newton, W.E. and Orme-Johnson, W.H.(eds)(1972). Nitrogen fixation. University Park Press, Baltimore. pp 17-26.
25. Smith, F.A.(1973). The internal control of nitrate uptake into excised barley roots with differing salt contents. *New Phytol.* 72:769-782.
26. Ashley, D.A., Jackson, W.A. and Volk, R.J. (1975). Nitrate uptake and assimilation by wheat seedlings during initial exposure to nitrate. *Plant Physiol.* 55: 1102-1108.
27. MacKown, C.T., Volk, R.J. and Jackson, W.A.(1981). Nitrate accumulation, assimilation and transport by decapitated corn roots. *Plant Physiol.* 68:133-138.
28. MacKown, C.T. and McClure, P.R.(1988). Development of accelerated net nitrate uptake. Effects of nitrate concentration and exposure time. 87: 182-186.
29. Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Ruth, T.J. and Mala, F.(1989). Studies of the regulation of nitrate influx by barley seedling using $^{15}\text{NO}_3^-$. *Plant Physiol.* 90:806-813.
30. Hole, D.J., Ali, M.E., Fares, Y. and Malcolm, C.D.(1990). Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. *Plant Physiol.* 93:842-847.
31. Rao, P.K. and Rains, D.W.(1976). Nitrate absorption by barley. I. Kinetics and energetics. *Plant Physiol.* 57:55-58.
32. Doddema, H. and Teikamp, G.P.(1979). Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. II. Kinetics. *Physiol. Plant.* 45: 332-338.
33. Ward, R.H., Aslam, M. and Huffaker, R.C.(1986). Enhancement of nitrate uptake and growth of barley seedlings by calcium under saline conditions. *Plant Physiol.* 80:520-524.
34. Dhugga, K.S., Waines, J.G. and Leonard, R.T.(1988). Correlated induction of nitrate uptake and membrane

- polypeptides in corn roots. *Plant Physiol.* 87:120-125.
35. Mc Clure, P.R., Kochian, L. V., Spanswick, R. M. and Shaff, J.E.(1990). Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. II. Measurement of NO_3^- and H^+ fluxes with ion-selective microelectrodes. *Plant Physiol.* 93:290-294.
 36. Mc Clure, P.R., Kochian, L. V., Spanswick, R. M. and Shaff, J.E.(1990). Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiol.* 93:281-289.
 37. Butz, R.G. and Jackson, W.A.(1977). A mechanism for nitrate transport and reduction. *Phytochemistry.* 16:409-417.
 38. Cawse, P.A.(1967). The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst.* 92:311-315.
 39. Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E., and Youngs, V.L.(1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil. Science and Plant Analysis.* 6(1):71-80.
 40. Snell, F.D. and Snell, C.T.(1949). Colorimetric methods of analysis. II. D. Van Nostrand Co., New York, USA. pp 85.
 41. Rufty, T.W. Jr., Israel, D.W. and Volk, R.J.(1984). Assimilation of $^{15}\text{NO}_3^-$ taken up by plants in the light and in the dark. 76:769-775.
 42. Pan, W. L., Jackson, W. A. and Moll, R.H.(1985). Nitrate uptake and partitioning by corn root systems. *Plant Physiol.* 77:560-566.
 43. Morgan, M.A., Jackson, W.A. and Volk, R.J.(1985). Uptake and assimilation of nitrate by corn roots during and after induction of the nitrate uptake system. *Journal of Experimental Botany.* 36(187):859-869.
 44. Mackown, C.T., Jackson, W.A. and Volk, R.J.(1982). Restricted nitrate influx and reduction in corn seedlings exposed to ammonium. *Plant Physiol.*

45. Ingemarsson, B., Oscarson, P., Ugglas, M.A. and Larsson, C.M.(1987). Nitrogen utilization in *Zemna*. II. Studies of nitrate uptake using $^{15}\text{NO}_3^-$. Plant Physiol. 85:860-864.
46. Clarkson, D.T., Saker, L.R. and Purves, V.J.(1989). Depression of nitrate and ammonium transport in barley plants with diminished sulphate status. Evidence of coregulation of nitrogen and sulphate intake. Journal of Experimental Botany. 40(218):953-963.
47. Deane-Drummond, C. E. and Glass, A.D.M.(1983). Short term studies of nitrate uptake into barley plant using ion-specific electrodes and $^{36}\text{ClO}_3^-$. I. Control of net uptake by NO_3^- efflux. Plant Physiol. 73: 100-104.
48. Deane-Drummond, C. E. and Glass, A.D.M.(1983). Short term studies of nitrate uptake into barley plant using ion-specific electrodes and $^{36}\text{ClO}_3^-$. II. Regulation of NO_3^- efflux by NH_4^+ . Plant Physiol. 73:105-110.
49. Fuggi, A.(1989). Short-term regulation of nitrate uptake by a 'pump and leak' mechanism in the acidophilic nonvacuolated alga, *Cyanidium caldarium*. Biochimica et Biophysica Acta. 974:141-148.
50. Goyal, S.S. and Huffaker, R.C.(1986). The uptake of NO_3^- , NO_2^- and NH_4^+ by intact wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. I. Induction and kinetics of transport systems. Plant Physiol. 82:1051-1058.
51. Romero, J. M., Lara, C. and Guerrero, M.G.(1989). Determination of intracellular nitrate. Biochem. J. 259:545-548.
52. Tompkins, G.A., Jackson, W.A. and Volk, R. J.(1978). Accelerated nitrate uptake in wheat seedlings: Effects of ammonium and nitrite pretreatments and of 8-methylpurine and puromycine. Physiol. Plant. 43:166-171.
53. Frost, W.B., Blevins, D.G. and Barnett, N.M.(1978). Cation pretreatment effects on nitrate uptake, xylem exudate, and malate levels in wheat seedlings. Plant

- Physiol. 61:323-326.
54. Macduff, J.H., Hopper, M.J. and Wild, A.(1987). The effect of root temperature on growth and uptake of ammonium and nitrate by *Bassola napus* L.c.v. Bienvenue in flowing solution culture. Journal of Experimental Botany. 38(196):53-66.
 55. Macduff, J.H. and Wild, A.(1989). Interactions between root temperature and nitrogen deficiency influence preferential uptake of NH_4^+ and NO_3^- by oilseed rape. Journal of Experimental Botany. 40(211):193-206.
 56. Clement, C.R., Hopper, M.J. and Jones, L.H.P.(1978). The uptake of nitrate by *Xellium perenne* from flowing nutrient solution. Journal of Experimental Botany. 29(109): 453-464.
 57. Bowman, D.C. and Paul, J.L.(1988). Uptake and assimilation of NO_3^- and NH_4^+ by nitrogen-deficient perennial Ryegrass Turf. Plant Physiol. 88:1303-1309.
 58. Jackson, W.A., Volk, R.J., Morgan, M.A., Pan, W.L. and Toyker, R.H.(1988). Nitrogen uptake and partitioning by roots. In: Maize, J.C., Shannon, D.P. and Boyer, C.D.(eds)(1986). Regulation of carbon and nitrogen reduction and utilization. The American Society of Plant Physiologists. pp 101.
 59. Serrano, R.(1990). Plasma membrane ATPase. In: Larsson, C. and Moller, I.M.(eds)(1990). The plant plasma membrane. Springer-Verlag. Berlin, Germany. pp 127-153.
 60. Schumaker, K.S. and Sze, H.(1987). Decrease of pH gradients in tonoplast vesicles by NO_3^- and Cl^- ; Evidence for H^+ -coupled anion transport. 83:490-496.
 61. Christensen, C.M.(1964). Effect of moisture contents and length of storage period upon germination percentage of seeds of corn, wheat and barley. Free of storage fungi. Phytopathology. 54:1454-1466.
 62. Neyra, C.A. and Hageman, R.H.(1975). Nitrate uptake and induction of nitrate reductase in excised corn roots. Plant Physiol. 56:692-695.
 63. Dhugga, K.S., Waines, J.G. and Leonard, R.T.(1988).

- Nitrate absorption by corn roots. Inhibition by phenylglyoxal. *Plant Physiol.* 88:759-763.
84. CIMMYT(eds)(1980). Hechos y tendencias mundiales relacionadas con el trigo. Nuevamente la revolución del trigo : Tendencias recientes y retos futuros. México, D.F. pp 57.
85. Ostle, B. and Mensing, R. W.(1975). Statistics in research. The Iowa State University Press/AMES. USA pp 503.