



161  
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DEL DETERIORO EN EL CRECIMIENTO  
HETEROTROFICO Y EL ESTABLECIMIENTO DE  
LA AUTOTROFIA EN PLANTULAS DE MAIZ**

**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 :

**PATRICIA PEDREGUERA QUINTANA**

MEXICO, D. F.

1992

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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 GENERAL

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	6
OBJETIVOS	8
MATERIAL Y METODOS	9
- Material Biológico	9
- Deterioro de Semillas	9
- Determinación de la Velocidad de Germinación	10
- Evaluación del Vigor de las Plántulas	10
- Extracción de la Nitrato Reductasa	11
- Ensayo para la Actividad de Nitrato Reductasa	12
- Determinación de Nitritos	12
- Determinación de Nitratos	13
- Cuantificación de Proteínas	13
- Análisis Estadístico	15
RESULTADOS	16
- Caracterización de los Lotes de Semillas	16
- Efecto del Deterioro en el Crecimiento Heterotrófico	16
- Influencia del Deterioro en la Capacidad Fototrófica	19
- Actividad Azeotrófica en Plántulas Control	

y Deterioradas	22
- Efecto del Deterioro en el Establecimiento Autotrófico	25
DISCUSION	33
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFIA	37

## INDICE DE TABLAS

	PAGINA
- Tabla 1. Efecto del Deterioro en el Desarrollo de la Capacidad Fototrónica	24
- Tabla 2. Efecto del Deterioro en la Actividad de Nitrato Reductasa en Plántulas de Maíz	26
- Tabla 3. Concentración de Nitratos presentes en 5 ml. de Extracto Enzimático en Plántulas de Maíz Control y Deterioradas	27
- Tabla 4. Contenido de Proteína Soluble Total en Extractos Enzimáticos de Plántulas de Maíz Control y Deterioradas	31

## INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
- Figura 1. Velocidad de germinación de los lotes control y deteriorado.	17
- Figura 2. Influencia del deterioro en el crecimiento heterotrófico en plántulas de maíz, en condiciones de oscuridad y en ausencia de nitratos.	18
- Figura 3. Efecto del deterioro en la movilización de reservas durante el crecimiento heterotrófico en plántulas de maíz, en condiciones de oscuridad y en ausencia de nitratos.	20
- Figura 4. Capacidad fototrófica de las plántulas deterioradas crecidas en luz y en ausencia de nitratos.	21
- Figura 5. Movilización de reservas durante la adquisición de la fototrofia en plántulas de maíz, crecidas en luz y en ausencia de nitratos.	23
- Figura 6. Efecto del deterioro durante el establecimiento autotrófico en plántulas de maíz, crecidas con luz y en presencia de nitratos.	29
- Figura 7. Movilización de reservas durante el establecimiento autotrófico en plántulas de maíz, crecidas con luz y en presencia de nitratos.	30

## RESUMEN

En los cereales, las distintas etapas de crecimiento se encuentran delimitadas por eventos bioquímicos y fisiológicos. Este hecho permite que los cereales constituyan un sistema adecuado para estudiar el efecto del deterioro durante la germinación y el desarrollo de la plántula.

Estudios anteriores han mostrado que, en el caso del trigo, la movilización de reservas (medida como actividad de  $\alpha$ -amilasa) se encuentra dañado en semillas deterioradas. Así mismo la Actividad de Nitrato Reductasa (ANR) está disminuida, lo que podría explicar la menor talla de las plántulas deterioradas.

En este trabajo se determinó el efecto del deterioro en las diferentes etapas del desarrollo en plántulas de maíz. Se encontró que el crecimiento heterotrófico está notablemente disminuido en las plántulas deterioradas. La adquisición de la capacidad fototrófica se vio retrasada en las plántulas deterioradas, con respecto a los controles. Se observó que la capacidad azeotrófica, medida como ANR (expresada por g. de peso fresco y por parte aérea), está disminuida en las plántulas procedentes del lote deteriorado. Por lo anterior, en estas plántulas se encuentra alterado el establecimiento autotrófico.

## INTRODUCCION

La semilla es la estructura a partir de la cual se desarrolla un esporofito. En las plantas con semilla, ésta juega un papel preponderante en la continuidad entre las generaciones sucesivas. En las Angiospermas, la capacidad para producir semillas ha permitido la predominancia de este grupo dentro de las plantas actuales (Esau, 1977).

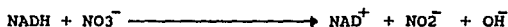
El desarrollo de un nuevo individuo a partir de una semilla se inicia con la germinación. Esto incluye numerosos eventos: hidratación, cambios estructurales a nivel celular, respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular (Khan, 1982). La combinación de ellos permite la transformación de un embrión con metabolismo basal hacia uno con metabolismo activo (Bewley, 1986). Una vez que la semilla ha germinado se inicia otra etapa de gran importancia: el crecimiento heterotrófico, donde, el desarrollo de la plántula se lleva a cabo a expensas de las reservas del endospermo, las cuales son movilizadas hacia el eje embrionario en crecimiento gracias a la intervención de enzimas que hidrolizan el almidón, como la  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa, y otras. (Bewley, 1986). En esta fase del crecimiento, el nitrógeno necesario para la síntesis de aminoácidos se obtiene a través de la hidrólisis de las proteínas de reserva (Padilla, 1987). Durante el crecimiento heterotrófico, la plántula desarrolla las actividades tróficas (fijación de CO<sub>2</sub> y asimilación de nitrógeno) y energéticas necesarias para adquirir la autotrofia. Se dice que una planta se ha establecido autotróficamente una vez que ésta agota las reservas del endospermo y, logra acoplar la fotosíntesis con la



asimilación de nitrógeno (Padilla,1987).

Durante el crecimiento de la plántula, la adquisición de los factores fototróficos juegan un papel determinante. Este fenómeno implica la maduración y desarrollo de los cloroplastos. La luz estimula y controla la producción de los precursores de la clorofila, así como la síntesis de las macroproteínas y de los pigmentos que forman a los fotosistemas I y II. Una vez que el cloroplasto ha madurado, se inician las funciones fotosintéticas, es decir, la fijación de CO<sub>2</sub> (Salisbury, 1978).

El nitrógeno autotrófico se adquiere a través de la asimilación de iones nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) o amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Salisbury,1978). El primer paso en la reducción del ion nitrato es catalizado por la Nitrato Reductasa (NR), que realiza la transformación de nitratos a nitritos (Campbell, W.H. and Smarrelli, J., 1986). La NR es una enzima multimérica. Cada monómero contiene tres grupos prostéticos redox activos: FAD, hemo y el cofactor molibdeno, en una relación estequiométrica de 1:1:1 que, en ese orden, catalizan la transferencia de dos electrones, ya sea del NADH o NADPH al nitrato (Solomonson, 1990). La forma enzimática común en las plantas superiores es la NADH:NR (Caboche,1990). La reacción realizada por la NR es la siguiente:



Cerca del 25% de la energía producida durante la fotosíntesis se consume en la asimilación de los nitratos, por lo que este

proceso desde el punto de vista energético es de importancia biológica fundamental (Guerrero,1981). Debido a que los nitratos son la fuente principal de nitrógeno, su asimilación y su reducción constituyen el paso limitante para el crecimiento de una planta (Solomonson,1990). Existe un gran interés en el estudio de la regulación de la NR, debido a la importancia de esta enzima en la adquisición de la autotrofia . Por lo anterior, en este trabajo, la actividad de NR se utilizó como índice del establecimiento autotrófico de la plántula.

Bajo condiciones de almacenamiento, las semillas se deterioran. Es importante mencionar que existen al menos tres factores dignos de atención, pues determinan la viabilidad de la semilla en el almacén y las causas de su deterioro, se trata de la temperatura, la humedad relativa y las presiones de oxígeno (Tiburcio,1985).

Aun cuando la semilla está viva y mantiene su capacidad para germinar, el deterioro dá lugar a individuos de menor talla que la normal y, con poca adecuación para sobrevivir los rigores del campo. A este tipo de semillas se les llama de bajo vigor (Association of Official Seed Analysts, 1983).

Biológicamente, el vigor de la semilla se basa en su constitución genética, pues establece el potencial fisiológico máximo. La susceptibilidad al deterioro y la pérdida de vigor se determinan tanto por las características genéticas de la especie, como por todos aquellos eventos que ocurren durante el desarrollo de la semilla: su cosecha, su secado y su almacenamiento (Association of Official Seed Analysts,1983).

Desde el punto de vista bioquímico y celular, el deterioro ocasiona diferentes alteraciones dependiendo del tipo de semilla de la cual se trate (Bewley, 1986). Sin embargo, algunos de los daños ocasionados por el deterioro son comunes a todas las semillas.

En lo que se refiere a los cambios a nivel molecular, los lípidos y las proteínas son los más afectados. El contenido de lípidos disminuye por el almacenamiento prolongado. Cuando existen altos contenidos de humedad los niveles de fosfolípidos declinan drásticamente (Gidrol, X. et al., 1989; Priestley, 1986). En cuanto a las proteínas, se ha encontrado que el deterioro altera la solubilidad de estas. En el maíz, las proteínas del endospermo disminuyen su solubilidad conforme declina la viabilidad (Bewley, 1986). Además, la semilla deteriorada presenta alteraciones en la síntesis de novo de enzimas de importancia en el desarrollo (Bewley, 1986; Priestley, 1986).

A nivel celular, se ha visto que el deterioro ocasiona lesiones directas en la estructura mitocondrial o daños a nivel del desarrollo de las mitocondrias. La disminución en las tasas de consumo de O<sub>2</sub> se asocia con este fenómeno (Priestley, 1986).

Existen otras alteraciones en las semillas deterioradas: pérdida de la compartimentalización celular, cambios en la actividad de aquellas enzimas determinantes en el crecimiento de la plántula, fallas en la reparación de DNA, cambios en la integridad del DNA, y otras. Dependiendo de la susceptibilidad de la semilla al deterioro, será la extensión del daño en el almacén (Priestley, 1986).

## ANTECEDENTES

El deterioro de una semilla es un proceso gradual, que suele manifestarse a nivel fisiológico durante la germinación y el crecimiento de la plántula (Padilla, 1987; Tiburcio, 1985; Bernal-Lugo, 1990). Se percibe desde una fase inicial, por una disminución en la velocidad de germinación, sin embargo el grado de deterioro puede ser mas profundo y manifestarse con un decremento en la velocidad de crecimiento durante el desarrollo de la plántula y, en una etapa mas grave con la pérdida de viabilidad de la semilla (Bernal-Lugo, 1990).

Desde el punto de vista bioquímico se ha encontrado que en trigo el deterioro disminuye el vigor de las semillas, alterando algunas funciones bioquímicas de la aleurona y algunas actividades enzimáticas y de transporte de iones asociadas al crecimiento de la plántula. La actividad de  $\alpha$ -amilasa fue menor en aleuronas deterioradas que en el control (Rodríguez, 1991). La actividad de NR, acumulación y transporte de  $\text{NO}_3^-$ , fue menor en plántulas provenientes de semillas deterioradas que en aquéllas que procedieron de semillas control (Padilla, 1987; San Miguel, 1991).

Lo anterior sugiere que el deterioro de semillas puede afectar uno o varios de los procesos del desarrollo de una plántula, es decir, la movilización de reservas, el crecimiento heterotrófico y/o el establecimiento autotrófico de la plántula.

El grupo de los cereales es un sistema adecuado para estudiar el efecto del deterioro durante el desarrollo de la plántula, debido a que en ellos las diferentes etapas del crecimiento se encuentran delimitadas por eventos bioquímicos

particulares para cada fase.

El objetivo del presente trabajo fue ampliar los conocimientos que se tienen respecto al deterioro de las semillas en los cereales, para lo cual se escogió al maíz como material biológico de estudio. Existe una gran cantidad de estudios sobre la fisiología del maíz, aun así no logramos encontrar información acerca de los efectos del deterioro sobre las etapas que anteceden al establecimiento autotrófico de la plántula.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar las alteraciones ocasionadas por el deterioro en plántulas de maíz, durante el crecimiento heterotrófico y el establecimiento de la autotrofia.

### Objetivos Particulares

I.- Determinar la movilización de reservas y el desarrollo en plántulas deterioradas, crecidas en condiciones de oscuridad y ausencia de  $\text{NO}_3^-$ , para conocer si se encuentra alterado o no el crecimiento heterotrófico.

II.- Caracterizar la capacidad fototrófica y azeotrófica en las plántulas deterioradas, para poder discernir si una o ambas se encuentran dañadas.

III.- Analizar la capacidad de establecimiento autotrófico de las plántulas deterioradas, cuantificando su crecimiento como acumulación de peso seco en condiciones de luz y en presencia de nitratos.

## MATERIAL Y METODOS

### MATERIAL BIOLOGICO

En este trabajo se utilizaron semillas de maiz híbrido, CPS-HT-1 cosecha 1989. Estas fueron almacenadas a 4°C en frascos de vidrio, con bolsas de sílica gel. Para los experimentos, las semillas fueron previamente seleccionadas, de entre las mejores de acuerdo a su integridad física.

### DETERIORO DE SEMILLAS

El lote control, así como el de las semillas que se sometieron al deterioro, fueron precondicionados en 100% de humedad relativa y a temperatura ambiente durante 12 horas, para evitar que las células del embrión sufrieran un choque osmótico al entrar en contacto con el agua (Priestley, 1986). Posteriormente, las semillas se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio, al 2%, durante dos minutos, y se pusieron a secar, durante 12 horas, en una campana estéril de flujo laminar.

Para la obtención de la semilla deteriorada, se empleó el método de envejecimiento acelerado, que consiste en someter el lote a temperaturas y humedades relativas elevadas (Tiburcio, T.L. 1985). Las semillas se colocaron en bolsas de malla de plástico y fueron introducidas en frascos de vidrio de 6.5 cm. x 16 cm., los cuales contenían una solución saturada de KCl

para proporcionar 85% de humedad relativa, las bolsas se colocaron evitando que tuvieran contacto con la solución. Una vez cerrado el frasco, se le introdujo en una estufa marca "Felisa" a 30°C durante 20 días. Cuando se completaron los días de deterioro, se les determinó el contenido de humedad (Moreno, M.E. 1984) a las semillas y se realizaron las pruebas de velocidad de germinación y de vigor.

#### DETERMINACION DE LA VELOCIDAD DE GERMINACION

Las semillas fueron colocadas en papel estrasa húmedo. Una hoja de papel de 43 cm.x 60 cm. fue doblada en 4 partes y se depositaron 15 semillas por hoja, estas fueron cubiertas con otra capa de papel húmedo y enrolladas en forma de "taco". Los "tacos" fueron incubados a 25°C en una cámara de germinación a 100% de humedad relativa. La prueba se realizó en la oscuridad y, cada 24 horas, se determinó el porcentaje de germinación acumulada.

#### EVALUACION DEL VIGOR DE LAS PLANTULAS

Las semillas fueron sembradas en charolas de plástico de 27 cm. de ancho x 37 cm. de largo y de 10 cm. de altura. Se colocó una capa de 3 cm. de vermiculita, sobre la cual se sembraron las semillas (36 semillas por charola) y, se cubrieron con una capa de 1cm. de espesor. Se realizaron varias pruebas: ya fuera con luz constante (con una intensidad de 5000 lux, provenientes de bulbos de neón de 40 watts), ya en oscuridad y regadas con o



nitratos. Se tomó una muestra no menor de 10 plántulas, a partir del cuarto día en el caso de las plántulas crecidas con luz y a partir del sexto día para las crecidas en la oscuridad, se separaron los endospermos, raíces y hojas y se les determinó el peso seco. Los endospermos fueron secados a 100°C durante 3 días, en tanto que raíces y hojas se secaron a 80°C por 3 días.

#### EXTRACCION DE LA NITRATO REDUCTASA

Se hicieron dos determinaciones de la actividad de la Nitrato Reductasa para ambos lotes, la primera a los 6 días y la segunda a los 10 días decrecimiento. La extracción de la enzima se realizó de la siguiente forma: se tomaron al azar entre 15 y 20 canopias y se cortaron en trozos pequeños, se pesaron 2 g. de peso fresco y se congelaron con nitrógeno líquido en un mortero. Una vez que el nitrógeno comenzó a evaporarse se realizó la molienda hasta polvo fino y se dejó a temperatura ambiente. Cuando se inició la descongelación del polvo, se le agregaron 5 ml. de buffer de extracción (25mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mM L-Cisteína, 15 % glicerol, pH 7.8) [Campbell, W.H. et al, 1978; Kuo, T. et al, 1980; Oji, Y. et al, 1988]. Antes de iniciar la extracción se le adicionó el buffer, el cual contenía inhibidores de proteasas en una proporción de 1 ml. por cada ml. de buffer (Leupectina 10 mM, TLCK 0.065 mM y PMSF 1.5 mM) (Sherrard, J.H., y col. 1979; Redinbaugh, M.G. y col. 1981; Remmler, J.L. y col. 1986). La suspensión formada se homogenizó rápidamente y se filtró a través de 4 capas de gasa. El filtrado se recibió en tubos de centrifuga corex de 15 ml., previamente

enfriados y, se centrifugaron a 10 000 rpm en una centrifuga "Beckman" J2-21, rotor JA-20 por 10 minutos a 4°C.

#### ENSAYO PARA LA ACTIVIDAD DE LA NITRATO REDUCTASA

En tubos de ensayo de 12 mm. x 100 mm. se adicionaron 0.4 ml. de buffer de actividad, 1.0 ml. de sustrato (KNO<sub>3</sub> 0.01 M preparado con buffer de actividad) y 100 ml. de NADH 5 mM recién preparado. Por último se agregaron 0.5 ml. del sobrenadante del extracto enzimático (Sherrard, J.H. et al 1979; Nakagawa, H. et al 1981). El ensayo se realizó a 30°C. Transcurridos 20 minutos se detuvo la reacción adicionando 100 ml. de acetato de zinc (1M pH 4). Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos. Se le adicionó al sobrenadante, 100 ml. de una disolución de metasulfato de fenazina (PMS 30mM), con el fin de oxidar el NADH remanente para que este no interfiriera con la determinación de nitritos durante el desarrollo de color. Transcurridos 10 minutos, se tomó, una alícuota para cuantificar los nitritos producidos.

#### DETERMINACION DE NITRITOS

A una alícuota del ensayo enzimático (no mayor de 1.0 ml, en caso de que fuera menor se completaba a 1.0 ml con buffer de actividad), se le adicionaron 0.5 ml. de una disolución ácida de sulfanilamida (1% de sulfanilamida y 10% de ácido tricloroacético

en HCl 3 N), y se añadieron 0.5 ml. de una disolución de N-(1-naftil) etilendiamida (NNEDA 0.02%), por último se agitó. Al blanco de reactivos se le adicionó 1.0 ml. de buffer de actividad. Se dejaron pasar 10 minutos y se leyó la absorbancia a 540 nm.

Para la curva patrón, se utilizó una disolución de nitrito de sodio 100 mM, recién preparada a partir de un stock de nitrito de sodio 100mM que contenía 6.5 mM de NaOH, para evitar la reducción del nitrito por el CO<sub>2</sub> ambiental (Padilla, M.I. 1987).

#### DETERMINACION DE NITRATOS

Esta se hizo con un electrodo de nitratos marca "Orion", para lo cual se tomaron 2 ml. de extracto enzimático. Se le adicionó 0.5 ml. de una solución 2M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para ajustar la fuerza iónica de las muestras, y 0.25 ml. de una solución saturada de ácido bórico. La muestra se llevó a 25 ml. con agua bidestilada y se tomó la lectura como potencial del electrodo en mV (Deane-Drummond, C.E., et al 1983).

Para la curva patrón, se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de KNO<sub>3</sub> (10, 100 y 1000 ppm). A cada muestra se le adicionó 1 ml. de sulfato de amonio, 0.5ml. de la solución de ácido bórico. Finalmente la muestra se llevó a 50 ml. y se le tomó la lectura. Los valores en milivolts fueron graficados con su concentración de nitratos correspondiente, en papel semilogarítmico.

## CUANTIFICACION DE PROTEINAS

Se realizó por el método de Lowry modificado por Peterson (Peterson, G.L. 1977).

### Reactivos:

- 1) Desoxicolato de sodio 0.15% (DOC).
- 2) Acido tricloroacético 50% (TCA).
- 3) Solución de carbonato tartrato de cobre (CTC).

### Preparación del CTC:

A una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10 % se le adicionó  $\text{CuSO}_4$ , hasta una concentración de 0.1 % y tartrato de potasio hasta el 0.2 % (solución estable por 2 meses a temperatura ambiente).

- 4) Dodecil sulfato de sodio al 10 % (SDS).
- 5)  $\text{NaOH}$  0.8 N.
- 6) Reactivo de Folin-Ciocalteu.

Reactivo A: Se mezclaron partes iguales de los stocks de CTC,  $\text{NaOH}$ , SDS, y  $\text{H}_2\text{O}$  (reactivo estable 2 semanas a temperatura ambiente).

Reactivo B: Un volumen del reactivo Folin-Ciocalteu se mezcló con 5 volúmenes de agua bidestilada.

Procedimiento: De acuerdo a la cantidad de proteína en la muestra, se tomó una alícuota conteniendo de 20 a 25 mg. de proteína, esta se completó a 0.9 ml. con agua bidestilada, a cada tubo se le añadió 0.1 ml. de DOC, 0.1 ml. de TCA, se agitó y se incubó a  $4^\circ\text{C}$  por 10 minutos. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se descartó y los tubos se dejaron escurrir para

eliminar el agua al máximo. A cada pastilla se le añadió 1.0 ml. de agua y 1.0 ml. de reactivo A, se dejó incubar 10 minutos, a temperatura ambiente, y, por último, se adicionaron 0.5 ml. del reactivo B. Esto se agitó y se dejó reposar, durante 30 minutos. Se leyó la absorbancia a 750 nm. La curva patrón se hizo con BSA, ésta fue lineal en el rango de 20 a 80 mg. de BSA.

#### ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico utilizado fue la "t" de Student con un  $\alpha=0.05$ , debido a que la cantidad de muestras que se tenían nunca fue mayor de 10 (Gil, S.I., 1986). El análisis fue aplicado en los experimentos para cuantificar la ANR, la determinación de proteínas y en las curvas de crecimiento.

## RESULTADOS

### CARACTERIZACION DE LOS LOTES DE SEMILLAS

La viabilidad y el t50 de germinación (tiempo en el cual se alcanza el 50% de la cuenta total de la germinación), fue mayor para el lote control (LC) que para el lote deteriorado (LD) [figura 1]. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores (Padilla,1987; Tiburcio,1985), e indican que las semillas se deterioran durante el almacenamiento y que las condiciones de temperatura y humedad relativa (30<sup>o</sup>C y 85 % respectivamente), utilizadas en este trabajo, no son apropiadas para mantener la calidad de germinación de las semillas de maíz en el almacén.

### EFFECTO DEL DETERIORO EN EL CRECIMIENTO HETEROTROFICO

Durante la fase de emergencia de la plántula, el crecimiento esta sostenido exclusivamente por las reservas del endospermo, por lo que a esta etapa del crecimiento de la plántula también se le denomina crecimiento heterotrófico. Para observar solo la contribución de las reservas al crecimiento de las plántulas, estas fueron crecidas en la oscuridad y en ausencia de nitratos. La figura 2 muestra que la acumulación de peso seco por plántula es menor en el lote deteriorado que en el control. Esto podría deberse a que la capacidad para movilizar las reservas en la plántula proveniente de semillas deterioradas, fuese menor que en las plántulas control y/o, a que la asimilación de las reservas por la plántula misma estuviese disminuida. Para decidir entre estas dos posibilidades, se determinó el peso seco de los

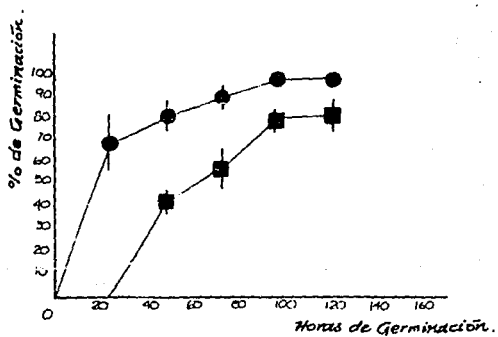


Figura 1. Velocidad de germinación de los lotes control y deteriorado.

Control (—●—); deteriorado (—■—).

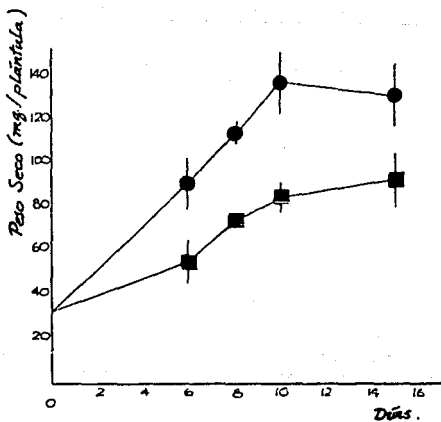


Figura 2. Influencia del deterioro en el crecimiento heterotrófico en plántulas de maíz, en condiciones de oscuridad y en ausencia de nitratos.

Control (—●—); deteriorado (—■—).



endospermos a diferentes edades de la plántula (figura 3). En plántulas provenientes de semillas deterioradas, la velocidad de movilización de reservas, medida como la pendiente en la gráfica de la figura 3, fue menor (13.9 mg./día) que en las control (17.5 mg./día), lo cual indica que la menor acumulación de peso seco observado en plántulas deterioradas, es debido, al menos en parte, a que el deterioro disminuye la capacidad de la semilla para movilizar sus reservas.

#### INFLUENCIA DEL DETERIORO EN LA CAPACIDAD FOTOTRÓFICA

Para que se realice el establecimiento autotrófico de la plántula es necesario que los procesos tróficos se encuentren activos y acoplados. Dichos procesos son la fotosíntesis (fototrofia) y la reducción de nitratos (azeotrofia) [Padilla,1987]. Con el fin de determinar la capacidad de las plántulas control y deterioradas para adquirir la actividad fototrófica (fijación de  $\text{CO}_2$ ), ambos lotes de semillas se crecieron en presencia de luz y ausencia de  $\text{NO}_3^-$ . La figura 4 muestra que en presencia de luz, al igual que en la oscuridad (figura 2), las plántulas deterioradas acumularon menor cantidad de peso seco que las controles, pero cuando en un mismo lote se comparó el peso seco acumulado por plántula, crecidas en luz contra las crecidas en la oscuridad (comparar figuras 2 y 4), se encontró que en presencia de luz, las plántulas control acumularon mayor cantidad de peso seco que las crecidas en la oscuridad. Durante los primeros 8 días de crecimiento, las plántulas deterioradas crecidas ya fuera en luz o en oscuridad, acumularon la misma cantidad de peso seco. En el décimo día, las plántulas

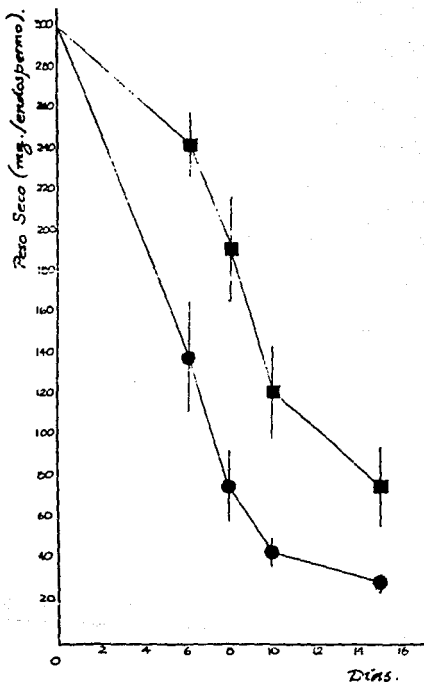


Figura 3. Efecto del deterioro en la movilización de reservas durante el crecimiento heterotrófico en plántulas de maíz, en condiciones de oscuridad y ausencia de nitratos.

Control (—●—); deteriorado (—■—).

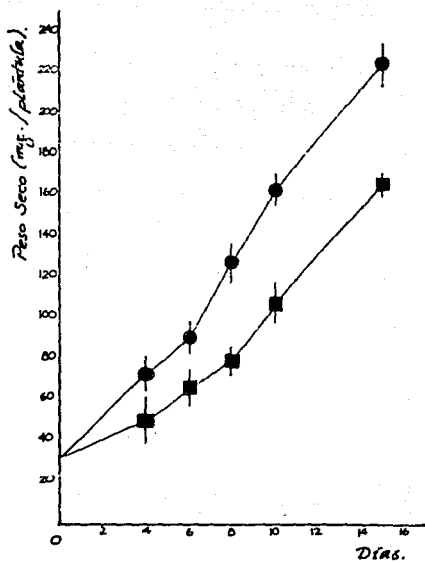


Figura 4. Capacidad fototrófica de las plántulas deterioradas crecidas en luz y en ausencia de nitratos.

Control (—●—); deteriorado (—■—).

deterioradas crecidas en la luz, acumulan mayor cantidad de peso seco que las crecidas en la oscuridad (Comparar figuras 2 y 4). En cuanto a la movilización de reservas (figura 5) en las plántulas crecidas en la luz, el punto de mayor crecimiento se alcanzó casi sin modificación de la movilización de reservas en las plántulas deterioradas, en tanto que en las plántulas control significó un mayor gasto de reservas (figura 5). El hecho de que la acumulación de materia seca (figura 4), inducido por la luz, fuese mayor que el incremento en la movilización de reservas, indica que en ambos lotes de plántulas la fotosíntesis está activa: en las plántulas control desde el octavo día de crecimiento y para las plántulas deterioradas a partir del día 10. Para cuantificar el efecto del deterioro en la actividad fototrófica de la plántula, se determinó la cantidad de peso seco acumulado por efecto de la fotosíntesis y, se expresó como la diferencia entre el peso de las plántulas crecidas en la luz, menos el peso seco de las plántulas crecidas en la oscuridad, los datos se muestran en la tabla 1. En ambos lotes de plántulas, el peso seco aumentó por la actividad fotosintética (figura 4) y, de nuevo se observó que dicha actividad se establece a partir del día 8 en las plántulas control y, entre el octavo y décimo día para las plántulas deterioradas. Sin embargo, la actividad fototrófica encontrada en las plántulas deterioradas, siempre fue menor que en las control (figura 4). Estos resultados indican que la actividad fototrófica de las plántulas se vió afectada por el deterioro.

#### ACTIVIDAD AZEOTROPICA EN PLANTULAS CONTROL Y DETERIORADAS

El análisis de la actividad azeotrófica en ambos lotes de semillas, se realizó cuantificando la actividad de Nitrato

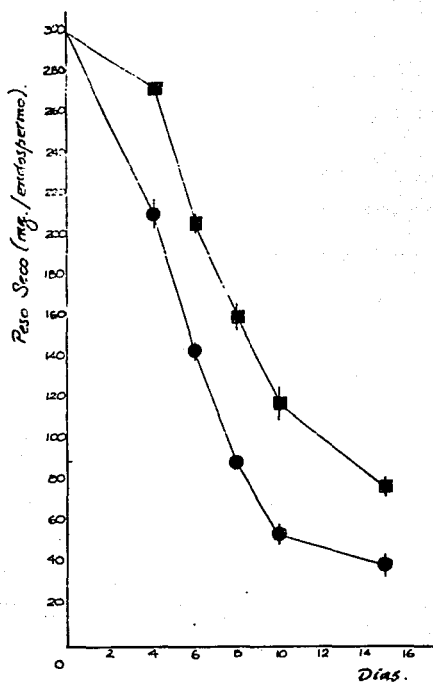


Figura 5. Movilización de reservas durante la adquisición de la fototrofia en plántulas de maíz crecidas con luz y en ausencia de nitratos.

Control (—●—); deteriorado (—■—).

Tabla 1. Efecto del Deterioro en el Desarrollo de la Capacidad Fototrófica.

Días de Crecimiento	Capacidad Fototrófica	
	mg de peso seco/plántula	
	CONTROL	DETERIORO
8	13.45	5.64
10	26.11	22.69
15	93.47	74.38

Nota.- El incremento en fotosíntesis se obtuvo restando el peso seco acumulado de las plántulas crecidas en oscuridad y sin nitratos, el peso seco acumulado de las plántulas crecidas en la luz y en ausencia de nitratos.

Reductasa, que presentaban las plántulas crecidas por 6 y 10 días en presencia de  $\text{NO}_3^-$  (tablas 2). Las plántulas de ambos lotes fueron capaces de inducir y acumular Nitrato Reductasa (tabla 2). Cuando la actividad de Nitrato Reductasa se expresó en nanomolas de  $\text{NO}_2^-$ /minuto/g. de peso fresco o por mg. de proteína, fue similar y constante a lo largo del período estudiado. Sin embargo, cuando la actividad se expresó en nanomolas de  $\text{NO}_2^-$  por parte aérea (tabla 2), la actividad de Nitrato Reductasa a los 6 días de crecimiento, fue similar en ambos lotes, pero a los 10 días de crecimiento la actividad enzimática aumentó considerablemente en el lote control respecto al deteriorado. Para saber si los datos anteriores eran resultado de una mayor acumulación de  $\text{NO}_3^-$  en las plántulas control, que en las plántulas deterioradas, se cuantificó la concentración de  $\text{NO}_3^-$  presentes en los extractos enzimáticos. En la tabla 3 se muestran los resultados, cuando el contenido de nitratos se expresa en moles por parte aérea, en el lote control se presenta una concentración ligeramente mayor de este anión, pero no significativa en comparación al deteriorado, por el contrario, este hecho no se observa cuando los valores se expresan en moles de  $\text{NO}_3^-$  por gramo de peso fresco.

#### EFFECTO DEL DETERIORO EN EL ESTABLECIMIENTO AUTOTROFICO

Para conocer si ambos lotes de plántulas presentaban la misma capacidad para establecerse como organismo autotrófico, se determinó el efecto de los  $\text{NO}_3^-$  en la acumulación de peso seco y, se cuantificó la proteína soluble tanto en plántulas provenientes de semillas deterioradas como de semillas control.

La adición de nitratos al agua de riego, incrementó la

Tabla 2. Efecto del Deterioro en la Actividad de Nitrato Reductasa en Plántulas de Maíz.

Actividad de		lote	6 días de crec.	10 días de crec.
nmolas NO <sub>2</sub> /g.P.F./min.	C	<sup>1</sup> 32.62 ± 9.53 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	36.98 ± 3.27 <sup>F</sup> <sub>a</sub>	
	D	<sup>I</sup> 39.44 ± 12.07 <sup>A</sup> <sub>b</sub>	27.98 ± 1.53 <sup>G</sup> <sub>b</sub>	
nmolas NO <sub>2</sub> /P.A./min.	C	<sup>2</sup> 13.81 ± 4.94 <sup>B</sup> <sub>C</sub>	42.74 ± 7.23 <sup>H</sup> <sub>d</sub>	
	D	<sup>II</sup> 20.51 ± 10.28 <sup>C</sup> <sub>e</sub>	24.63 ± 3.77 <sup>I</sup> <sub>e</sub>	
nmolas/min./mg.prot.	C	<sup>2</sup> 15.12 ± 4.71 <sup>D</sup> <sub>f</sub>	22.07 ± 4.22 <sup>J</sup> <sub>g</sub>	
	D	<sup>II</sup> 20.86 ± 3.92 <sup>E</sup> <sub>h</sub>	22.19 ± 1.40 <sup>J</sup> <sub>h</sub>	

Nota.- Subíndices iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas, subíndices distintos indican que hay diferencias. Letras mayúsculas comparan el lote control vs lote deteriorado en forma vertical; letras minúsculas comparan a los lotes entre sí a diferentes días de crecimiento en forma horizontal; ambas comparaciones para una misma forma de expresión de ANR. Los números que aparecen en la ANR a los 6 días de crecimiento comparan en forma vertical a los lotes entre sí en las distintas formas de expresión de la actividad enzimática.



Tabla 3. Concentración de Nitratos Presentes en 5 ml. de Extracto Enzimático en Plántulas de Maíz Control y Deterioradas.

Días de crec.	moles de $\text{NO}_3^-$ /g. peso fresco $\times 10^{-4}$		moles de $\text{NO}_3^-$ / parte aérea $\times 10^{-4}$	
	control	deterioro	control	deterioro
6	$2.51 \pm 2.48$	$2.67 \pm 2.36$	$1.95 \pm 0.37$	$1.35 \pm 1.28$
10	$1.75 \pm 0.72$	$1.81 \pm 0.76$	$1.96 \pm 0.63$	$1.67 \pm 0.87$

Nota.- Al aplicar la prueba estadística no se encontraron diferencias significativas, en ninguno de los casos.

acumulación de peso seco de las plántulas control, en comparación con aquéllas que crecieron en ausencia del anión, este efecto no se observó en las plántulas deterioradas durante los primeros 10 días de crecimiento (figura 6). El efecto benéfico del anión  $\text{NO}_3^-$  en el crecimiento de las plántulas control, estuvo acompañado por un ligero aumento en la movilización de reservas (figura 7). El incremento en la movilización de reservas por influencia del  $\text{NO}_3^-$ , también se observó en las plántulas deterioradas, sin embargo, este hecho no se puede correlacionar con el incremento en la acumulación de peso seco por la plántula, como es el caso de las plántulas control (figuras 6 y 7). Dado que la fototrofia en las plántulas control se establece en el octavo día y en las deterioradas en el día 10, es probable que la reducción de nitratos inicialmente se realiza utilizando el carbono que proviene de la movilización de reservas.

En la tabla 4 se observa que durante los primeros 8 días de crecimiento en agua y luz, la cantidad total de proteína soluble en ambos tipos de plántulas es similar, sugiriendo que ambos tipos de plántulas presentan la misma capacidad para sintetizar proteínas. La disminución en el contenido de proteínas que se observó en plántulas de 13 días de crecimiento en ausencia de  $\text{NO}_3^-$ , podría deberse a que la asimilación de carbono continuase aun cuando la cantidad de proteína se mantuviera constante, quizás porque en este tiempo ya se agotó la reserva nitrogenada proveniente del endospermo. La presencia de nitratos aumenta el contenido de proteínas tanto en las plántulas control, como en las deterioradas. Sin embargo, en las controles se percibe un aumento

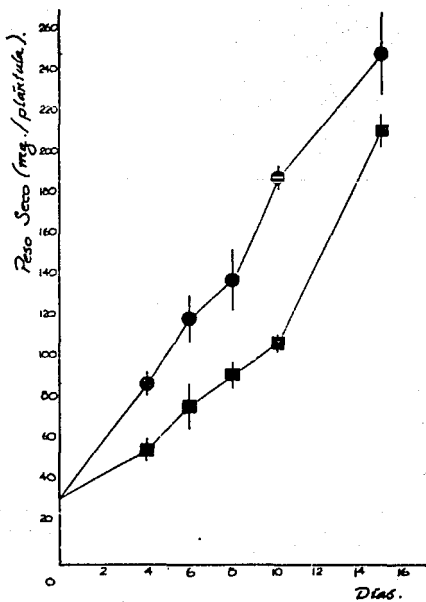


Figura 6. Efecto del deterioro durante el establecimiento autotrófico en plántulas de maíz crecidas con luz y en presencia de nitratos.  
Control (—●—); deteriorado (—■—).

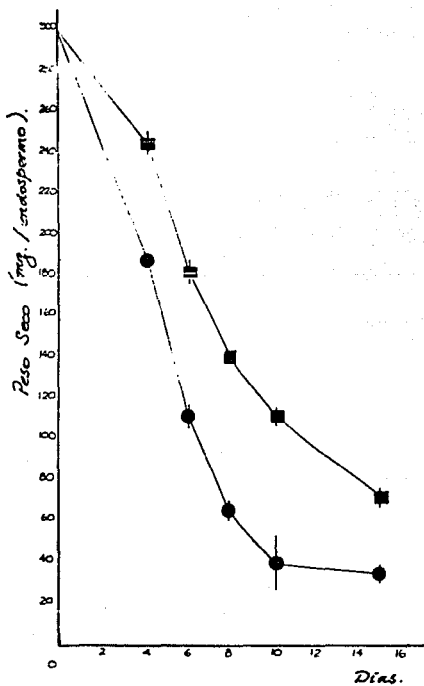


Figura 7. Movilización de reservas durante el establecimiento autotrófico en plántulas de maíz crecidas con luz y en presencia de nitratos. Control (—●—); deteriorado (—■—).

Tabla 4. Contenido de Proteína Soluble Total en Extractos Enzimáticos de Plántulas de Maíz Control y Deterioradas.

mg. de proteína/ mg. de peso seco

Días de crec.	control		deterioro	
	+ NO <sub>3</sub>	- NO <sub>3</sub>	+ NO <sub>3</sub>	- NO <sub>3</sub>
6	86.28 <sup>±</sup> 3.68 <sup>a</sup>	72.17 <sup>±</sup> 2.19 <sup>b</sup>	97.47 <sup>±</sup> 4.40 <sup>c</sup>	61.97 <sup>±</sup> 3.75 <sup>d</sup>
8	99.27 <sup>±</sup> 0.00 <sup>e</sup>	75.92 <sup>±</sup> 3.61 <sup>g</sup>	76.50 <sup>±</sup> 4.44 <sup>g</sup>	75.72 <sup>±</sup> 1.41 <sup>g</sup>
13	130.63 <sup>±</sup> 4.24 <sup>h</sup>	35.72 <sup>±</sup> 10.39 <sup>i</sup>	97.21 <sup>±</sup> 9.11 <sup>j</sup>	59.50 <sup>±</sup> 8.75 <sup>k</sup>

Nota.- Subíndices iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas.

constante a lo largo del periodo de crecimiento estudiado, mientras que en las deterioradas no se observa ningún aumento a lo largo de todo el periodo. En ambos tipos de plántulas se establece la autotrofia, pero en las plántulas control ésta funciona con mayor eficiencia. En el caso de las plántulas deterioradas lo anterior podría deberse a que la síntesis de proteínas estuviese disminuída, o a que la Nitrato Reductasa no esta activa en la misma proporción.

## DISCUSION

Con el fin de evidenciar las alteraciones ocasionadas por el deterioro en el desarrollo de las plántulas de maíz, se estudió en forma comparativa la capacidad de crecimiento heterotrófico y autotrófico, mostrado por las plántulas provenientes de semillas de maíz control y deterioradas. La capacidad de crecimiento se determinó como el peso seco acumulado por plántula a diferentes días de desarrollo.

Una vez que la semilla ha germinado (protrusión de la radícula), el eje embrionario continua su desarrollo utilizando como única fuente de sustratos a las reservas almacenadas en el endospermo (Bewley, 1986). Esta etapa del crecimiento del organismo corresponde a la fase previa a la emergencia de la plántula, por lo que los experimentos para demostrar el efecto del deterioro en el crecimiento, se realizaron en la oscuridad y en ausencia de  $\text{NO}_3^-$ . Para la movilización de reservas, la aleurona sintetiza y secreta al endospermo almidonoso diversas hidrolasas, como son las  $\alpha$ -amilasas y las proteasas (Bewley, 1986). En trigo se ha demostrado que el deterioro disminuye la capacidad de la aleurona para sintetizar  $\alpha$ -amilasas (Rodríguez, 1991), así como la capacidad de la semilla para movilizar sus reservas (Padilla, 1987). Los resultados reportados en este trabajo demuestran que en la semilla de maíz, el deterioro al igual que en el trigo, produce una disminución en la velocidad de movilización de reservas. Esta disminución en la movilización de reservas, observada en plántulas de maíz que provienen de semillas deterioradas, podría estar determinada por una menor producción de  $\alpha$ -amilasa, o bien, por una menor demanda de sustratos por el embrión. Los resultados

descritos anteriormente, indican que la menor velocidad de emergencia, que presentan las plántulas provenientes de semillas deterioradas, se debe, al menos en parte, a que se encuentra disminuida la movilización de reservas.

En el campo, una vez que la semilla emerge, el crecimiento es sostenido tanto por lo que aun queda de reservas, como por los productos de la actividad autotrófica de la plántula, es decir, la fijación de CO<sub>2</sub> por la fotosíntesis y la reducción de nitratos.

En el laboratorio, a diferencia de lo que sucede en el campo, se puede disectar la actividad azetotrófica de la fototrófica. Cuando las plántulas son sembradas en soportes inertes en presencia o ausencia de luz y, en ambos casos se riega con agua, la diferencia en la acumulación de peso seco entre uno y otro tratamiento, constituye una medida indirecta de la actividad fotosintética de la plántula, siempre y cuando la luz no modifique la velocidad de movilización de reservas. Utilizando la estrategia anterior, en este trabajo se cuantificó la actividad fotosintética de plántulas provenientes de semillas control y deterioradas. Los resultados mostraron que la actividad fotosintética para ambos lotes de plántulas fue similar, de donde se concluye que en el maíz el deterioro de las semillas no afecta la capacidad fototrófica de la plántula y, que la menor acumulación de peso seco que se observa en plántulas deterioradas, se debió principalmente al retraso que presentan estas plántulas durante el crecimiento heterotrófico, y que se mantiene a lo largo del desarrollo. Siendo esta una posible explicación a la menor talla que presentan las plántulas deterioradas respecto a las control (Khan, 1982).



La adquisición de la actividad azeotrófica esta determinada por la capacidad de la plántula para asimilar y reducir los nitratos. Estudios anteriores demostraron que en el caso del trigo, la actividad azeotrófica se encuentra alterada en las plántulas procedentes de semillas deterioradas, medida tanto como por la capacidad para asimilar nitratos del medio (San Miguel,1991), como por la capacidad para reducir los nitratos (actividad de Nitrato Reductasa) [Padilla,1987]. En el caso del maíz se encontró, al igual que en el trigo, que se encuentra modificada la capacidad de reducción de nitratos. Este último hecho nos permite afirmar que las plántulas de maíz deterioradas, presentan alteraciones en la movilización de reservas y en la adquisición de los factores tróficos y energéticos. Lo anterior tiene como resultado que las plántulas de maíz deteriorado, esten retrasadas en el crecimiento en comparación con las plántulas control.

## CONCLUSIONES

- El crecimiento heterotrófico se encontró modificado negativamente en las plántulas deterioradas.
- Existe un retraso en la adquisición de los factores fototróficos en las plántulas deterioradas.
- La capacidad azeotrófica (medida como Actividad de Nitrato Reductasa), se encontró alterada en las plántulas deterioradas en comparación con las plántulas control.
- Estas alteraciones se expresan en el crecimiento de las plántulas deterioradas como un retraso en el establecimiento autotrófico, con respecto a las plántulas control.

## BIBLIOGRAFIA

-Association of Official Seed Analysts: (1983). Seed Vigor Testing Handbook.

-Bernal-Lugo, I. (1990). Caracterización de algunos eventos bioquímicos que participan en el deterioro de semillas. XVIII Congreso Nacional de Bioquímica. San Luis Potosí, México.

-Bewley, J.D. (1986). Cap.2. Membrane Changes in Seeds as Related to Germination and the Perturbations Resulting from Deterioration in Storage. Physiology of Seed Deterioration. M.B. McDonald, Jr. and C.J. Nelson. USA. 27-45pp.

-Caboche, M. and Rouzé, P. (1990). Nitrate Reductase: A target for molecular and cellular studies in higher plants. TIG 6: 187-192.

-Campbell, W. H. and Smarrelli, J. (1978). Purification and kinetics of higher plant NADH:nitrate reductase. Plant. Physiol. 61,611.

-Campbell, W. H. and Smarrelli, J. (1986). Chapter I. Nitrate Reductase: Biochemistry and Regulation. Vol. II. Biochemical Basis of Plant Breeding. Ed. CRC Press, Boca Ratón.

-Deane-Drummond, C.E. and Glass, A.D.M. (1983). Short Term Studies of Nitrate Uptake into Barley Plants Using Ion-Specific Electrodes and  $^{36}\text{ClO}_3^-$ . Plant Physiol. 73:100-104.

-Esau, K. (1977). Anatomy of Seed Plants. 2nd. Edition. John Wiley and Sons, USA. 550pp.

-Gil, S.I y Zárate de Lara, G. P. (1986). Métodos Estadísticos. Trillas, México. 643 pp.

- Gidrol, X.; Serghini, H.; Noubhani, A.; Mocquot, B. and Mazliak, P. (1989). Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. I. Lipid peroxidation and membrane damaged. *Physiol. Plant.* 76:591-597.
- Guerrero, M.G. et al. (1981). The assimilatory nitrate reducing system and its regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32:169-204.
- Khan, A.A. (1982). *The Physiology and biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination.* Elsevier Biomedical Press, USA. 547pp.
- Kuo, T.; Kleinhofs, A. Warner, R.L. (1980). Purification and partial characterization of nitrate reductase from barley leaves. *Plant. Sci. Lett.* 17:371.
- Moreno, M.E. (1984). Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. UNAM.
- Nakagawa, H.; Yonemura, Y.; Yamamoto, H.; Sato, T.; Ogura, N. and Sato, R. (1985). Spinach Nitrate Reductase. Purification, Molecular Weight and Subunit Composition. *Plant Physiol.* 77:124-128.
- Oji, Y. et al. (1988). NADH-dependent Nitrate Reductase from two-row barley roots: Purification, Characteristics and Comparison with Leaf Enzyme. *Physiol. Planta.* 72:1221-126.
- Padilla, M. I. (1987). Participación de la Nitrato Reductasa en la Expresión del Vigor de Plántulas de Trigo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more general applicable. *Analytical Biochem.* 83:346-356.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Priestley, D.A. (1986). Seed aging. Cornell University Press, USA.
- Redinbaugh, M.F. and Campbell, W.H. (1981). Purification and Characterization of NAD(P)H:Nitrate Reductase and NADH:Nitrate Reductase from Corn Roots. *Plant Physiol.* 68:115-120.
- Remmler, J.L. and Campbell, W.H. (1986). Regulation of Corn Leaf. II. Synthesis and Turnover of the Enzyme's Activity and Protein. *Plant Physiol.* 80:442-447.
- Rodríguez Penagos, M. (1991). Actividad de  $\alpha$ -amilasa en aleuronas de semillas de trigo deterioradas. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.
- Salisbury, F.B. and Ross, C.L. (1978). *Plant Physiology*. 2nd. Edition. Wadsworth Pub. Co. Inc. USA. 422pp.
- San Miguel Chávez R. (1991). Comparación de la absorción de nitratos por raíces de trigo provenientes de semillas control y deterioradas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Sherrard, J.H. and Dalling, M.J. (1979) In vitro Stability of Nitrate Reductase from Wheat Leaves. *Plant Physiol.* 63:346-353.
- Solomonson, L.P. and Barber, M.J. (1990). Assimilatory Nitrate Reductase: Properties and Regulation. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 41:225-53.
- Tiburcio, T.L. (1986). Caracterización Bioquímica de la Capa de Aleurona de Semillas de Bajo Vigor. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.