



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“PERFIL DE PROTEÍNAS TOTALES DE *Zea mays*
SOMETIDO A ESTRES NUTRIMENTAL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

OSCAR ZUÑIGA LEMUS

ASESOR: DR. RICARDO VICTOR SANTIAGO DIAZ

COASESOR: Q.F.B. LUIS ALBERTO PARRA OAXACA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Perfil de proteínas totales de Zea mays sometido a
estrés nutrimental

que presenta el pasante: Oscar Zuñiga Lemus
con número de cuenta: 9205724-7 para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Junio de 2004

PRESIDENTE	Dr. Ricardo V. Santiago Díaz	
VOCAL	MFC. Ma. Eugenia Posada Galarza	
SECRETARIO	Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda	
PRIMER SUPLENTE	QFB. Héctor Coss Garduño	
SEGUNDO SUPLENTE	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por darme la energía necesaria para lograr levantarme cuando ha estado en el suelo, y seguir caminando y luchando en este mundo. Por haberme enseñado que no se puede caminar en este mundo sin amor y sin fe, y que la fe no se puede medir, pesar o cuantificar simplemente existe para el que la quiera tomar. Gracias por cuidarme siempre, permitirme seguir adelante y por haber puesto en mi camino a la mujer más maravillosa que puede haber conocido.

A la UNAM

Por darme ese gran tesoro llamado conocimiento, por brindarme la oportunidad de concluir una licenciatura, por proporcionarme un espacio para desarrollarme como estudiante y persona, y por que ha sido y será por mucho tiempo mi alma Mater. GRACIAS

A mis padres:

MARIA ESTHELA Y BALTAZAR. Por haberme dado uno de los regalos más valiosos que existen en este mundo "la vida" y uno de los tesoros más grandes "una carrera". A pesar de que no se los digo y ha veces no se los demuestro LOS AMO como no tienen idea, gracias por todo lo que me han dado y me siguen dando.

A mis SOBRINOS:

Por ser el rayito de luz que brilla en la oscuridad en un camino de tropiezos y amarguras, porque con sus rizas, gritos, cantos y travesuras iluminan más que una casa, iluminan el mundo. Pase lo que pase siempre estarán en mi corazón, Los amo.

A VERONICA:

Por que me enseñaste que ha este mundo hemos venido para ser felices y no se necesita de muchos bienes materiales o de muchos reconocimientos para serlo, sólo se necesita desearlo y estar dispuesto a vivir.

Por que eres la persona con la que quiero estar compartiendo éxitos y fracasos durante todos los días de mi vida. No puedo dejar de amarte, y lo único que puedo decirte es GRACIAS por ser como eres y permitirme estar a tu lado.

Aún no se como, ni porque pasaron así las cosas pero no me importa porque soy muy feliz y no cambiaría ni el más mínimo segundo desde que empezó. **TE AMO**

A mis Hermanas:

Lourdes, Veronica, Susana, Lilita y Mireya. por que sin su apoyo nada sería igual, LAS AMO y no quiero que cambien nunca por que la verdad es que me han enseñaron que el querer a una persona tiene muchas caras aunque no siempre las podamos reconocer por el orgullo. Gracias.

A mis cuñados:

A todos y cada uno por formar parte de mi familia y apoyarme siempre. GRACIAS

A mis amigos:

Arturo Charles, Victor Hugo Rocha, Cuauhtemoc Martínez, Hector Lira, Pablo Zamora, Sergio Campos, Alejandro Fuentes, Zita Janette, Guadalupe Nolasco, Martha Juárez, Guadalupe Sariñan, Ricardo Vidal, Mayra Hernández, Iván Dzib, Blanca Olvera, Daniel Decaro, Severo Tlachí, Ana Julia Núñez, David Puente. Por que sin ustedes no sería lo que soy, siempre serán parte de vida, pues existe una unión más grande que la simple amistad. Gracias por ser lo como son y porque nunca me dejaron sólo cuando más lo necesite a todos Gracias (el orden no significa para que no estén de sentidos).

Al Dr. Ricardo Santiago Díaz:

Por que me ha enseñado que el camino del conocimiento no tiene por que ser pesado ni mucho menos tedioso, al contrario es un proceso divertido y de sorpresas donde nadie tiene la razón absoluta de las cosas, únicamente un pequeño fragmento de conocimiento. Por haberme permitido ser más que su alumno. Lo considero mas que un Maestro lo considero mi Amigo. Gracias por brindarme la oportunidad de trabajar con usted.

Al Q.F.B. Luis Alberto Parra Oaxaca:

Por haberme ayudado en la elaboración experimental de esta Tesis, así como por darme tu amistad y tu apoyo.

Al Dr. Arturo Aguirre:

Por su colaboración al proporcionarnos la información técnica y los suelos con se trabajó en esta Tesis.

In Memori

Al Q.F.B. Ramón Cendejan Ramírez:

Por toda la ayuda que me brindo durante su estancia en este mundo y aunque se ha adelantado a un lugar al que todos tenemos que llegar algún día, dejo en este planeta una semilla que no todos quieren reconocer "el ayudar al que se lo pedía", Gracias por haber sido mi Amigo.

A todos aquellos que directa o indirectamente ayudaron a que esto fuera posible Gracias Totales.

PDATA

Si alguien alguna vez, por errores del destino llegara a leer esta Tesis aparte de mis sinodales familiares y amigos, quisiera decirles que no traten de caminar al ritmo que todos los demás sigan el ritmo que la vida y su cuerpo les indica todo tiene un proceso, cuando tiene que llegar llegara, mientras eso pasa no desesperen ni dejen de luchar por lo que quieren, pues en este mundo existen muchas cosas que no son fáciles de conseguir, pero tampoco son imposibles. Luchen por lo que mas desean y se les concedera.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. GENERALIDADES <i>Zea mays</i>	2
1.1 Clasificación y Descripción Botánica	2
1.2 Ciclo fenológico	4
2. SUELOS	5
2.1 Vertisoles	5
2.2 Solonetz	7
2.3 Luvisoles	7
2.4 Suelos orgánicos, Arenosos y pH	8
2.5 Concepto de estrés	10
2.5.1 Tipos de estrés en plantas	10
2.6 Suelos y estrés en plantas	11
2.6.1 Suelos salinos y Salinización	11
2.6.2 Salinización de vertisoles	13
2.6.3 Factores que afectan las propiedades químicas de los suelos	14
2.6.4 Efecto salino en el crecimiento de las plantas	17
2.6.4.1 Clasificación de las plantas en base a su tolerancia a sales	17
2.6.4.2 Efectos nocivos de salinidad	19
2.6.4.3 Mecanismos moleculares de adaptación a salinidad	20

3. NUTRICIÓN VEGETAL	22
3.1 Concepto y Clasificación de los nutrientes	22
3.2 Funciones de los nutrientes minerales: macronutrientes para <i>Zea mays</i>	23
3.2.1. Nitrógeno	23
3.2.1.1 Asimilación y Fijación de nitrógeno	23
3.2.1.2 Reducción y asimilación de nitrato y osmorregulación	25
3.2.1.3 Asimilación de amonio	27
3.2.1.4 Localización en el retoño y raíces	31
3.2.1.5 Biosíntesis de proteínas	32
3.2.1.5.1 Proteínas de reserva	32
3.2.1.5.1.1 Legumina.	34
3.2.1.5.1.2 Vicilina	36
3.2.1.5.1.3 Prolaminas	37
3.2.1.5.1.4 Relación evolutiva de prolaminas	39
3.2.1.5.1.5 Globulinas	40
3.2.1.6 Compuestos nitrogenados de bajo peso molecular	41
3.2.1.7 Suministro de nitrógeno, crecimiento y composición de la planta.	42
3.2.2. Fósforo	46
3.2.2.1. Papel en la transferencia de energía	47
3.2.2.2. Comportamiento y papel regulatorio de Fósforo	48
3.2.2.3. Administración de fósforo, crecimiento y composición de la planta.	51
3.2.3 Potasio	51
3.2.3.1 Compartimiento y concentración celular	52
3.2.3.2 Función metabólica del potasio	52
3.2.3.3 Suministro de potasio, crecimiento y composición de las plantas	53
3.2.3.4 Movimiento estromal	54

3.2.4	Azufre	56
3.2.4.1	A asimilación y reducción de sulfato	56
3.2.4.2	Función metabólica del azufre	58
3.2.4.3	Suministro de azufre. Crecimiento y composición de la planta.	59
3.2.5	Calcio	60
3.2.5.1	Forma de unión y compartimentación	60
3.2.5.2	Función metabólica. suministro y composición de Calcio en la planta	62
3.3	Funciones de los nutrientes minerales: micronutrientes para <i>Zea mays</i>	64
3.3.1	Hierro	64
3.3.1.1	Hemo proteínas	64
3.3.1.2	Proteínas Hierro-azufre	64
3.3.1.3	Localización del Hierro	65
3.3.2	Manganeso	66
3.3.2.1	Enzimas que contienen Manganeso	66
3.3.2.2	Deficiencia de manganeso y toxicidad	67
3.3.3	Cobre	67
3.3.3.1	Proteínas con cobre	68
3.3.3.2	Deficiencia de cobre	68

4	OBJETIVOS	69
	4.1 Objetivo general	69
	4.2 Objetivo particular	69
5	HIPÓTESIS	69
6	MATERIAL Y MÉTODOS	70
	6.1 Diseño experimental	70
	6.2 Planteamiento del problema	71
	6.3 Metodología	72
	6.3.1 Toma de muestra	72
	6.3.2 Homogenización	72
	6.3.3 Cuantificación de proteínas	73
	6.3.4 Electroforesis	74
	6.4 Material y Reactivos	77
7	RESULTADOS	78
8	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	98
9	CONCLUSIONES	107
10	ANEXO	108
11	REFERENCIAS	109

Índice de tablas y figuras.

Fig. 1 Influencia del pH en la disponibilidad de nutrientes en suelos orgánicos y minerales.	9
Fig. 2 Triangulo textural mostrando el % de arena, sedimento y arcilla en cada clase de textura	16
Fig. 3 Representación esquemática de la secuencia de asimilación de nitrito en las células de las hojas.	26
Fig. 4 Modelo de asimilación de amoniaco en raíces.	28
Fig. 5 Principales rutas metabólicas involucradas en la asimilación de amoniaco en raíces.	30
Fig. 6 Modelo de maduración de Legumina.	35
Fig. 7 Representación esquemática del efecto de incremento en los niveles en el suministro de nitrógeno para las raíces.	43
Fig. 8 Modelo del efecto de efecto de suministro de nitrógeno en el crecimiento de hojas.	45

Fig. 9 Lecitina.	46
Fig. 10 Modelo de regulación de la fosforilación y desfosforilación enzimática.	48
Fig. 11 Función regulatoria del pirofosfato en la síntesis de almidón y fotosíntesis.	50
Fig. 12 Modelo de apertura de estoma dirigido por bombas de protones y transportadores Cl/K (A) o transportadores K + Malato (B) hacia las vacuola.	55
Fig. 13 Ruta de asimilación de azufre en plantas superiores y algas verdes.	57
Fig.14 Representación esquemática de dos células adyacentes con una distribución típica de calcio (*).	60
Fig. 15 Proceso de transporte de calcio en la membrana celular para mantener regulado en nivel de calcio libre.	61
Fig. 16 Modelo del papel del calcio como segundo mensajero en la señal transduccional en plantas R= sitios receptores.	62
Fig. 17 Modelo de unión Hierro-Grupo tiol en proteínas.	65

Fig. 18. Función del magnesio en la fotosíntesis.	66
Fig. 19 Mecanismo de formación de la red de poliacrilamida.	75
Tabla 1. Algunos agentes estresantes que las Plantas experimentan Organizados bajo Clases Básicas.	11
Tabla 2 Clasificación y definición de las plantas en base a su tolerancia a sales.	18
Tabla No. 3 Sistemas de fijación de nitrógeno.	24
Tabla No. 4. Montaje del experimento.	70
Tabla No. 5. Curva de calibración de proteínas.	73
Tabla No. 6 Preparación de los geles de acrilamida.	76
Tabla No. 7 Pesos de las plantas por sustrato separado en tallo y raíz.	78
Tabla No. 8 Resultado de la curva de calibración de proteínas.	80
Tabla No. 9 Cuantificación de Proteínas.	81
Tabla No. 10 Tamaño de las plantas.	83

Tabla No. 11. promedio del número de hijas por planta	84
Tabla No. 12 Pesos Moleculares del estándar de proteínas.	85
Tabla No. 13 Pesos Moleculares obtenidos con cada sustrato (Raiz-Tallo).	85
Tabla No.14 Pesos de las plantas vs sustrato	95
Tabla No.15 Tamaño de las plantas vs sustrato	96
Tabla No.16 Número de Bandas vs sustrato.	97

Grafica No.1 Peso Total de plantas	79
Grafica No. 2 Curva de calibración de proteínas	80
Grafica No. 3 Cuantificación de proteínas totales.	82
Grafico No. 4 Tamaño de las plantas	83
Grafica No. 5 Promedio de hojas en cada sustrato.	84
Grafica No. 6 Curva Estándar de Marcadores moleculares.	85
Grafico No. 7 Geles de poliacrilamida y pesos moleculares.	89

I. INTRODUCCION

La importancia de los cereales (entre ellos el maíz) en la nutrición de millones de personas en todo el mundo es ampliamente reconocida, ya que además de ser una fuente de energía, suministran grandes cantidades de proteínas.

Un factor ambiental que limita la productividad de las cosechas o destruye la biomasa es referido como estrés o desorden(35).

Los suelos que son afectados por sales ocupan más del 7% de la superficie de la tierra, y representan un factor muy limitante en las cosechas(16). La salinidad en suelos o agua son los principales factores de estrés, especialmente, en regiones áridas o semiáridas(35). Las condiciones ambientales de estrés abiótico, sequía y salinidad son los principales factores que reducen la producción de las cosechas en el mundo(17).

El efecto mas general de estrés salino, como muchos otros tipos de estrés abióticos es la inhibición del crecimiento de la planta(17).

En base a estos antecedentes el presente trabajo tiene como finalidad demostrar la relación directa que existe entre los factores de estrés que afectan a las plantas de maíz y la respuesta fisiológica frente a tales condiciones.

Por lo cual se expuso la planta de maíz a diferentes condiciones de nutrición, salinidad, suelos, así como de pH, cuantificando la cantidad proteica y evaluando parámetros fenológicos (tales como numero de hojas, tamaño de la planta y peso) observándose una relación independiente de la planta a cada tratamiento dado, con lo cual se puede demostrar que la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés abiótico y nutrimental es multifactorial, y las características reflejadas tanto fenológicas como proteicas no se correlacionan entre los tratamientos, debido a que las plantas de maíz necesitan un conjunto de condiciones ambientales y nutrimentales óptimas para que se desarrollen de manera satisfactoria.

1. GENERALIDADES *Zea Mays*

1.1. CLASIFICACION Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Grupo de las Fanerogamas (plantas con flor)

13ª División Spermatofitas (plantas con una sola hoja cotiledonar)

Subdivisión Angiospermas (plantas con óvulos encerrados en el ovario)

Clase Monocotiledóneas (un Cotiledón)

Orden Gumifloras

Familia *Zea mays*(6).

El maíz palabra de origen indio caribeño, significa literalmente “lo que sustenta la vida”. El maíz que es junto con el trigo y el arroz uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y animales. Es una materia prima básica de la industria de la transformación con que se produce almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas y edulcorantes alimenticios(6).

El maíz, es una planta del género *Zea*, perteneciente a la familia de las gramíneas, subfamilia Andropogonácea, tribu maindea, identificada específicamente como *Zea mays* L.(2)

Como toda planta cultivada presenta una amplia variabilidad fenotípica: en general responde a la siguiente descripción: Planta anual; alta robusta y monoíca, con vaina sobrepuesta y limbos anchos conspicuamente dísticos; espiguillas estaminadas en racimos largos que se parecen a espigas; los racimos numerosos, formando paniculas largas y esparcidas; inflorescencias feminas; en las axilas de las hojas: las espiguillas en 8 a 16 hasta 30 hileras en raquiz engrosado y casi leñoso (olote), todo esto encerrado en numerosos brácteas o espantos faláceas (totomoxtle o holoche), los estilos largos saliéndose de la punta, como una masa de hilo sedoso (jilote), los granos en la madurez mucho más largos que las glumas (2).

Según Aldrich el maíz requiere temperaturas moderadas a calientes. El límite inferior para su crecimiento está entre 10 y 12^oC. El límite superior más favorable para el crecimiento depende de la humedad disponible(2).

Se le siembra de temporal, con probabilidades de obtener cosechas en zonas tan áridas como la altiplanicie de San Luis Potosí con precipitación total durante el año menor a los 40mm, hasta en la sierra de Hidalgo, Puebla y Veracruz, o en las selvas de Tabasco y Chiapas con lluvias anuales superiores a los 4.000 mm de precipitación total.

Con respecto a la luminosidad, se le cultiva en México desde los 14^o L.N. en el extremo sur del país, hasta las 32^o L.N. en la frontera con los E.U.. A nivel mundial, el rango de adaptación lega hasta los 50^oL.N. en algunos lugares de Rusia y Canada.(2)

No obstante este panorama, el maíz se siembra de temporal en todo el país, a excepción de las áreas francamente desérticas; esto se debe a las técnicas utilizadas por los productores de las diferentes regiones, los cuales van desde la siembra con espeque en los terrenos de fuerte pendiente y con bajísimos rendimientos; hasta la producción en suelos de alta calidad, con irrigación y elevados rendimientos; o bien en condiciones primitivas como en el caso de los sistemas trashumantes de "tumba-roza-quema", que contrasta con los sistemas de tecnificación avanzada que utilizan todos los instrumentos e insumos moderados. Las áreas donde se pueden lograr buenas cosechas deben disponer de precipitación pluvial bien distribuidas y que acumulen más de 800 mm de lluvia entre los meses de Mayo a Noviembre(2).

Estas áreas se localizan precisamente en los estados de la República que son los principales productores de grano: Jalisco, Veracruz, Chiapas, Michoacán y México(2).

1.2 CICLO FENOLOGICO DEL MAÍZ

Nascencia: comprende el periodo que transcurre desde la siembra hasta la aparición del coleóptilo, cuya duración aproximada es de 6 a 8 días.

Crecimiento: una vez nacido el maíz, aparece una nueva hoja cada tres días si las condiciones son normales. A los 15-20 días siguientes a la nascencia, la planta debe tener ya cinco o seis hojas, y en las primeras 4-5 semanas la planta deberá tener formadas todas sus hojas.

Floración: a los 25-30 días de efectuada la siembra se inicia la panoja en el interior del tallo y en la base de éste. Transcurridas 4 a 6 semanas desde este momento se inicia la liberación del polen y el alargamiento de los estilos.

Se considera como floración el momento en que la panoja se encuentra emitiendo polen y se produce el alargamiento de los estilos. La emisión de polen dura de 5 a 8 días, pudiendo surgir problemas si las temperaturas son altas o se provoca en la planta una sequía por falta de riego o lluvias.

Fructificación: con la fecundación de los óvulos por el polen se inicia la fructificación. Una vez realizada la fecundación, los estilos de la mazorca, vulgarmente llamados sedas, cambian de color, tomando un color castaño.

Transcurrida la tercera semana después de la polinización, la mazorca toma el tamaño definitivo, se forman los granos y aparece en ellos el embrión. Los granos se llenan de una sustancia leñosa, rica en azúcares, los cuales se transforman al final de la quinta semana en almidón.

Maduración y secado: hacia el final de la octava semana después de la polinización, el grano alcanza su máximo de materia seca, pudiendo entonces considerarse que ha llegado a su madurez fisiológica. Entonces suele tener alrededor del 35% de humedad.

A medida que va perdiendo la humedad se va aproximando el grano a su madurez comercial, influyendo en ello más las condiciones ambientales de temperatura, humedad ambiente, etc., que las características varietales (83).

2. SUELOS.

Las arcillas minerales en particular son muy vulnerables al ataque químico por las moléculas del agua. La estructura interna de las arcillas minerales presentan un desbalance de carga debido a la sustitución de los iones Si^{4+} y Al^{3+} por cationes de menor valencia. La electroneutralidad de las partículas arcillosas es satisfecha por la presencia de ciertos cationes (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , etc.) en la superficie(1,7).

2.1 VERTISOLES

Los vertisoles (del latín *vertere*, invertir) son suelos sumamente arcillosos que se desarrollan en climas de subhúmedos a secos. Al igual que los feozems, son profundos, muy duros cuando están secos y lodosos al mojarse (debido a su alto contenido de arcillas).
General de Estadística e Información Ambiental.

Los vertisoles son suelos arcillosos de color negro, presentan procesos de contracción y expansión, se presentan en superficies de poca pendiente y cercanos a los escurrimientos superficiales

La estructura laminar de las arcillas permite el almacenamiento de agua en el espacio interlaminar, formando así agregados lodosos difíciles de romper. La combinación de la arcilla con la materia orgánica del suelo y algunos óxidos minerales contribuye a la estabilidad estructural necesaria para resistir los efectos mecánicos destructivos. La porosidad interna de las hojuelas de arcilla y su carga electrostática asociada son adecuadas para la absorción de especies tales como los cationes de potasio (K^+), magnesio (Mg^{++}) y

amonio (NH_4^+), los cuales son liberados bajo condiciones ácidas apropiadas, pudiendo ser absorbidos por las raíces de las plantas(7).

La acidez es provocada por una acumulación de iones de hidrógeno (H^+) provenientes de compuestos químicos disueltos en el agua y acarreados por las lluvias; en ellos la concentración ácida llega a ser tal que algunos de los otros cationes atrapados por las arcillas, como los iones Al^{3+} se disuelven rápidamente en las soluciones, pasando a las raíces vegetales y provocando efectos tóxicos en las plantas. Es por ello que un suelo fértil debe estar balanceado en lo que a la acidez se refiere y el tratamiento en este caso consiste en la neutralización de la acidez mediante la agregación de compuestos alcalinos, como el carbonato de calcio. Luego tenemos que la combinación de acidez e intercambio iónico en las arcillas del terreno es importante en el desarrollo de los suelos agrícolas.

Las arcillas son las protagonistas en la formación de los suelos agrícolas y sus propiedades son determinantes para el crecimiento de los vegetales. Por otra parte, la mineralogía del suelo es resultado de diversos factores, el clima y el intemperismo, así tenemos que en las regiones tropicales predominan los caolines mezclados con óxidos minerales (oxisoles) y los suelos negros formados por esmectitas expandibles (vertisoles) combinadas. Si la acidez es baja ($\text{pH} > 6$) el suelo arcilloso tiende a ser rico en calcio, en cambio si la acidez es alta ($\text{pH} < 6$) el aluminio tiende a ser más abundante, lo que trae efectos tóxicos para la vegetación. Otros cationes, como el amonio, los nitratos y los fosfatos, también son retenidos por las arcillas del suelo e intercambiados bajo condiciones de humedad y acidez adecuadas, siendo realmente accesibles a las plantas y representando una fuente importante de nutrientes. La composición óptima del suelo debe incluir una fracción de arcilla compuesta de partículas menores a 2 micras, y una proporción mayor de sedimentos con tamaños de partícula entre 2 y 60 micras. Esta combinación parece incluir las mejores características para el cultivo y crecimiento de las raíces vegetales. Es claro, pues, que las arcillas son los componentes del suelo que provocan la mayor influencia en su productividad (84).

2.2 SOLONETZ

Son suelos que se caracterizan por el elevado valor de pH siendo conocidos por ello como salinos, el término alcalinización es usado para indicar el aumento en el valor de pH a valores alcalinos. Tiene que ser mencionado que altos valores de saturación de sodio no son necesariamente acompañados por valores altos de pH. El contenido de CaCO_3 en la superficie varía de poco más del 95%. A $\text{pH} > 8$, el suelo Solonetz es la unidad de suelo predominante. El Solonetz o suelo sódico se caracteriza por una Relación de Absorción de Sodio (SAR)* de la matriz del suelo mucho mayor a 15, y comúnmente contienen carbonatos de sodio(1).

* La relación de absorción de sodio o SAR describe una relación entre el sodio soluble y cationes solubles divalentes los cuales pueden ser usados para predecir el porcentaje de sodio intercambiado del suelo balanceado

$$\frac{[\text{Na}^+] \text{ soluble}}{[\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}]^{1/2} \text{ solubles}}$$

Las reacciones fuertemente alcalinas que dan la mayoría de los solonetz y muchos otros suelos sódicos y salinos-sódicos son debido a la presencia de cantidades apreciables de carbonatos y bicarbonatos en la solución del suelo(7,59).

2.3 LUVISOLES

Los luvisoles presentan un horizonte de acumulación de arcilla con saturación de bases superior al 50%. Los más abundantes son luvisoles óticos, crómicos, férricos y gleícos (84).

2.4 SUELOS ORGANICOS, ARENOSOS Y EL pH.

Los suelos que tienen alta cantidad de materia orgánica y arcilla tienen una mayor capacidad de intercambio iónico que los suelos que contienen arena. Los suelos anteriores tienen una gran capacidad de ligar agua. Estas dos características (capacidad de intercambio iónico y el ligar agua), y la concentración de minerales que componen el suelo, forman la base fundamental para disponer y transferir nutrientes del suelo a la raíz de la planta. Los suelos en alto contenido de arena tienen cargas negativas asociadas con ellos. Como resultado tales suelos tienen la capacidad de atraer y acumular cationes cargados positivamente, mientras, los aniones son repelidos y llegan a asociarse con la fase líquida (1).

La concentración de iones en solución depende en gran medida de la textura y composición de los suelos, la capacidad de intercambio iónico, la cantidad de agua en el suelo, y el pH este último juega un papel importante en establecer la disponibilidad de nutrientes para las plantas. pH's extremos pueden incrementar o disminuir la disponibilidad de elementos específicos, de esta manera causan deficiencia o toxicidad para las plantas que crecen en dichos suelos. Por primera instancia, pH alcalino limitan el Fe^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} , y a pH ácidos se incrementa la disponibilidad de Al^{2+} , Fe^{2+} y Mn^{2+} (Fig. 2)(7).

Como las raíces absorben nutrientes y agua del suelo, el equilibrio termodinámico entre los elementos unidos a partículas del suelo y estos en solución se desequilibra creando un gradiente iónico y de agua que favorece la remoción de los iones de las partículas del suelo y llenando los elementos disueltos y el agua en la vecindad de la rizosfera (59).

Suelos Orgánicos

Suelos minerales

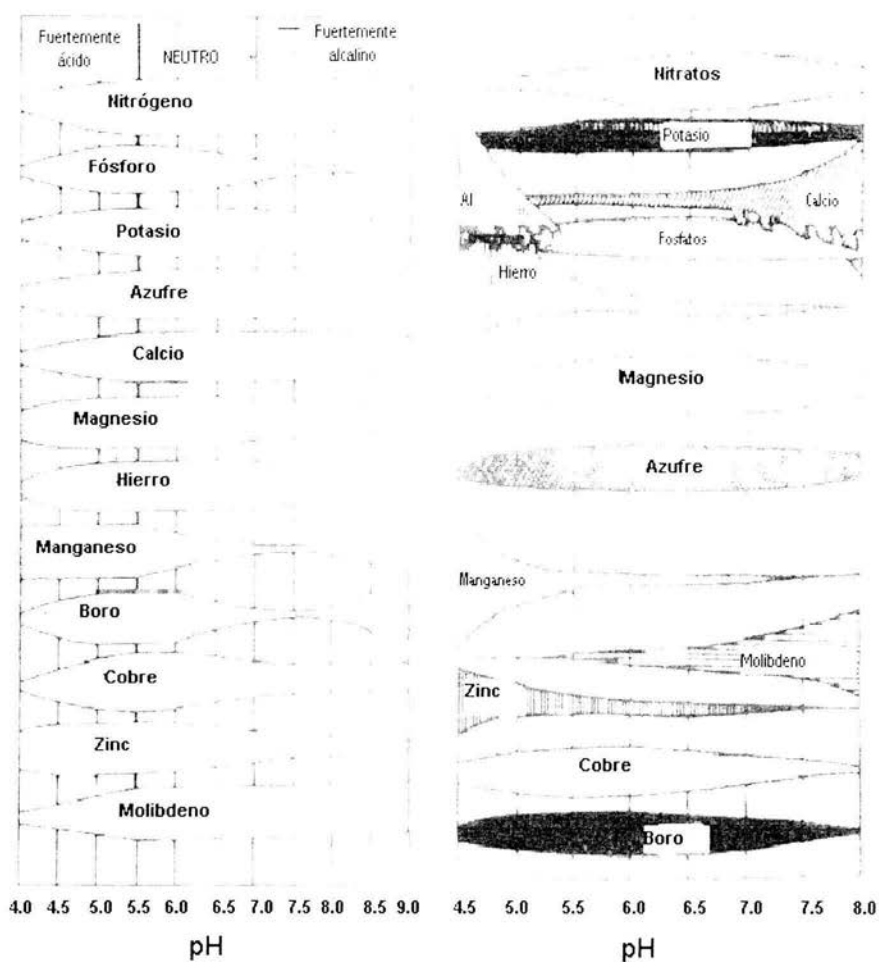


Figura 1. Influencia del pH en la disponibilidad de nutrientes en suelos orgánicos y minerales. El incremento en la anchura de la banda significa mayor disponibilidad de nutrientes. (Producción de Plantas en ambientes poco favorables. Copyright 1982 por John Wiley y Sons, Inc.)

2.5 CONCEPTO DE ESTRÉS

El concepto de estrés fisiológico puede ser simplemente un estado o un grupo de condiciones que causa un cambio aberrante en procesos fisiológicos eventuales resultando en daño sin embargo el termino de estrés se aplica a cualquier sistema trátese de orgánico u inorgánico pues todos sufren estrés aunque en diferentes condiciones.

La definición biofísica de estrés es la fuerza aplicada dividida por el área de la fuerza, o presión. El término estrés desde la fisiológica de las plantas es además reflectivo de la cantidad de presión ambiental por cambio de lugar en un organismo fisiológico. Tensión es definido como el cambio proporcional en una sustancia como una consecuencia de estrés (Niklas 1994). Tensión puede ser caracterizado como cambio fisiológico que ocurre en repuesta a factores ambientales (55).

2.5.1 TIPOS DE ESTRÉS EN PLANTAS

En el sentido más básico, el estudio de estrés fisiológico en plantas puede revelar mecanismos por el cual la fisiología de las plantas cambia para optimizar sus propiedades en respuesta al ambiente complejo biótico y abiótico. El estudio de la fisiología de las plantas esta íntimamente relacionado al estrés fisiológico y a las señales que regulan el desarrollo de la planta(17).

Un aspecto importante de la ciencia del ecosistema es biogeoquímica y los factores que regulan estos procesos. Los ciclos biogeoquímicos conciernen las transformaciones, velocidad de flujo, y tamaño de los elementos (tales como el calcio) como en estos reside el movimiento a través componentes bióticos y abióticos de ecosistema. Las plantas están íntimamente involucradas con ciclos biogeoquímicos de elementos importantes tales como Nitrógeno, Carbón, Fósforo y otros.

TABLA 1. Algunos agentes estresantes que las Plantas experimentan Organizados bajo Clases Básicas.

Físicos	Químicos	Bióticos	Antropogenicos
Sequía	Salinidad	Competencia	Contaminación del aire
Temperatura	Limitación de nutrientes	Herbívoros	Pesticidas
Radiación	pH del suelo	Patógenos	Metales pesados
Inundación	Suelos orgánicos	Alelopatía	Fuego
Viento	Gases atmosféricos	Mycorrhizae	Invasores extraños

La respuesta fisiológica a estrés puede ser dividida en dos posibilidades. a) Tolerancia, las plantas tienen mecanismos los cuales mantienen alta actividad metabólica (similar que en la ausencia de estrés) bajo estrés leve y reduce la actividad bajo estrés severo, b) Mecanismos de evasión que involucran una reducción de la actividad metabólica, resultando en un estado latente, sobre exposición a estrés extremo. Comúnmente una especie de planta puede tener distinta tolerancia, evitar mecanismos o una combinación de ambos(64).

2.6 SUELOS Y ESTRÉS SALINO EN PLANTAS

2.6.1 SUELOS SALINO Y SALINIZACION

La acumulación de sales en los suelos se produce en condiciones donde la vapotranspiración es mayor que la precipitación efectiva, por sales derivadas de rocas y sedimentos, o las aportadas en bajas concentraciones pero en largos periodos de tiempo, o en altas concentraciones por medio del riego superficial, o por el aporte de aguas subterráneas. La salinización es un fenómeno general que ocurre en zonas áridas y semiáridas, pero puede presentarse localmente en climas subhúmedos, son afloramientos locales freáticos de aguas subterráneas salinas, o la evaporación de aguas no salinas

provenientes del subsuelo donde la precipitación efectiva es baja debido a la pérdida de agua por escurrimientos(1.59).

Las regiones que están caracterizadas por suelos con alto contenido de sales solubles (suelos halomorfo) pueden ser divididos es salinos, sódico-salino, y localizaciones salinas (Brady 1974). La mayoría de sitios con alta concentración iónica en el suelo están en la categoría de salinos. Estos tiene alta concentración de sales solubles neutras con una conductividad eléctrica (E_c) > 4 mmohs cm^{-1} , y menos del 15% de su capacidad de intercambio cationica es ocupada por iones sodio. Los suelos que son sódicos-salinos tienen altas concentraciones de sales solubles ($E_c > 4$ mmohs cm^{-1}) y una capacidad de intercambio mayor a 15% ocupada por sodio. Aunque, ambos salino y sódico-salino tienen un pH debajo de 8.5. Una diferencia importante entre estos dos tipos de suelos es que en los suelos sódicos-salinos el pH y la concentración de Na^+ se incrementa grandemente, mientras que los suelos salinos permanece constante. Los suelos sódicos no contienen concentraciones altas de sales solubles neutras pero contienen cantidades significativas de sodio. Estos suelos sódicos comúnmente contienen pH alto (mayores a 10.0), debido a la hidrólisis de carbonato de sodio. El pH alto y la excesiva salinidad resultan del $NaCO_3$ causando que la superficie de los suelos sódicos no presente color(1).

La salinidad puede afectar diferentes procesos metabólicos, tales como la asimilación de CO_2 , síntesis de proteínas, respiración, metabolismo fitohormonal, etc. La toxicidad comienza con un desbalance de iones en los tejidos de la planta frecuentemente asociados con el exceso de Na^+ . La planta puede soportar hasta cierto grado este exceso de iones de Na^+ , regulando su asimilación o excretándolo. Este proceso requiere de una cantidad de energía extra y por esta razón las plantas sujetas a condiciones salinas presentan mayores valores de respiración y reducen el almacenamiento de azúcares en comparación con las plantas en condiciones no salinas. Bajo situaciones de alta intensidad luminosa las plantas muestran generalmente una mayor capacidad de mantener los balances iónicos en los órganos de la plantas, el desbalance iónico puede asociarse a los disturbios causados en la asimilación de CO_2 y a la reducción drástica de la transformación de lípidos(1).

La falta de energía, como una consecuencia de la salinidad, puede afectar varios procesos que requieren de ésta, tales como la asimilación de CO_2 , la síntesis de proteínas o la asimilación de N inorgánico. Las condiciones salinas restringen la síntesis de citocininas en las raíces y su translocación hacia las partes superiores de la planta puede ser inhibida. La síntesis de ácido abscísico, por otro lado es promovida(7).

La mayoría de las plantas son más sensibles a la salinidad durante la germinación que en cualquier otra etapa de crecimiento(17).

2.6.2 SALINIZACION DE VERTISOLES

En vertisoles, los efectos adversos de salinización de cultivos de riego tiende a minimizarse bajo ciertas circunstancias, debido a los fuertes procesos de expansión y agrietamiento de estos suelos pesados, arcillosos y esmectíticos. Durante el tiempo de riego o por acción de las lluvias, inmediatamente después del periodo de barbecho el suelo acarreará sales disueltas al subsuelo(1).

Mientras que un contenido de 15% en PSI (**P**orcentaje de **S**odio **I**ntercambiable) causa problemas en suelos arcillosos de mineralogía combinada, los vertisoles, con PSI de 6% al 20% se expande y se contrae fuertemente al humectarse y secarse respectivamente, sin afectar drásticamente sus propiedades físicas. A valores de PSI menores, el suelo tiende a permanecer masivo y poco permeable al estar seco, mientras que sólo a valores muy altos de PSI (>25%) un serio proceso de dispersión tomara lugar pero en condiciones de humedad. De manera que una cantidad que va desde moderada a alta de Na^+ intercambiable ayuda a mantener una buena estructura en los vertisoles. En los suelos frecuentemente ácidos ($\text{pH} < 4.5$), el complejo de cambio contiene una parte apreciable de Al^{3+} , el cual debido a su valencia causa una fuerte contracción de la doble capa difusa, aun con la presencia de cantidades muy grandes de Na^+ intercambiable(1,7).

2.6.3 FACTORES QUE AFECTAN LAS PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS SUELOS.

El suministro de nutrientes minerales puede afectar fuertemente el crecimiento y la morfología de la raíz. Este efecto es particularmente marcado con nitrógeno, poco distinto con fósforo y usualmente ausente con otros nutrientes, excepto para magnesio. En la zona respuesta (concentración donde el crecimiento de la planta está limitado por los nutrientes), el incremento en el suministro de nitrógeno, aumenta tanto el retoño como la raíz, pero usualmente el retoño crece más que la raíz, conduciendo a una típica caída de la proporción de peso seco retoño/raíz(56,59).

El agregar fertilizantes con fósforo es una práctica común y efectiva en suelos con baja concentración de fósforo soluble, para asegurar un adecuado suministro del nutriente a la raíz, especialmente en la etapa de crecimiento temprana cuando la temperatura del suelo es baja. En zonas donde el agregar fósforo en el fertilizante la densidad en el crecimiento de la raíz aumenta, aunque el efecto es relativamente pequeño comparado con la combinación de fertilizantes con nitrógeno-fósforo (72).

No sólo la formación de raíces laterales está influenciada por el suministro de nutrientes minerales, sino también la longitud y densidad de cabellos por raíz. Otra vez el nitrógeno y el fósforo parecen tener el efecto más pronunciado. La deficiencia de nitrógeno, como de fósforo, conduce a un incremento en la proporción de peso seco retoño/raíz(59).

El pH otro de los factores que afectan profundamente las propiedades químicas de los suelos, está determinado por un número de factores interactivos, incluyendo el tipo de material del cual el suelo fue derivado, condiciones ambientales, la cantidad y tipo de biota soportada por el suelo específico. En el suelo los H^+ pueden existir en solución o en un número de diferentes estados de adsorción, en partículas sólidas tales como la arcilla y materia orgánica (Allaway, 1957). De esta manera la acidez total del suelo se define como: acidez activa, la cual se refiere a la concentración de H^+ en solución y un gran número de

componentes referidos como potencial de acidez el cual toma en cuenta el potencial de iones intercambiables asociados con arcillas-coloide orgánicos que componen el suelo(7).

Como regla general el crecimiento de la raíz no es afectada por el pH externo en el rango de 5.0 – 7.5. En contraste a pH bajo menor a 5.0 el estrés es relativamente pequeño. El crecimiento de la raíz puede ser inhibida por pH altos directa o indirectamente. El efecto directo del pH alto es esperado en relación a la función del gradiente de pH transmembranal, gradiente electropotencial, y el cotransportador protón-anión de la membrana plasmática. El efecto directo de pH alto más conocido es la toxicidad por amoníaco. El alargamiento de la raíz es severamente inhibido por concentraciones de amoníaco menores de 0.05mM (Schenk and Wehrmann, 1979). La inhibición del crecimiento de las raíces a valores de pH menores de 5.0 esta estrechamente relacionado con la toxicidad de aluminio. El calcio juega un papel clave protegiendo el crecimiento de la raíz contra estrés de pH bajos. El requerimiento de calcio en el crecimiento de la raíz no esta fijado por estar en función del pH y la concentración de otros cationes incluyendo el aluminio(7, 26,59).

El tipo de suelo y textura esta basado en el tamaño, cantidad y tipos de minerales y compuestos orgánicos. Los componentes minerales de la tierra incluyen arcilla (<0.002mm), sedimento (0.002-0.02mm) y arena (0.02-2.0mm). Las partículas de arena y sedimento son mineralógicamente similares al cuarzo (SiO₂) difieren sólo en tamaño. Arena y sedimentos están divididos en silicatos, micas y feldespatos. Las arcillas generalmente consisten de minerales, tales como Kaolita, illite y montmorillonite. La arcilla contribuye considerablemente a la capacidad de intercambio catiónico (CEC) y la capacidad de carga electrostática de el suelo (Eijsackers, 1994). Esto es relativamente importante para canales de nutrientes en las raíces de la planta y otros organismos. El suelo exhibe diferentes porcentajes de minerales que se clasifican en varias categorías (FIG 1) (7).

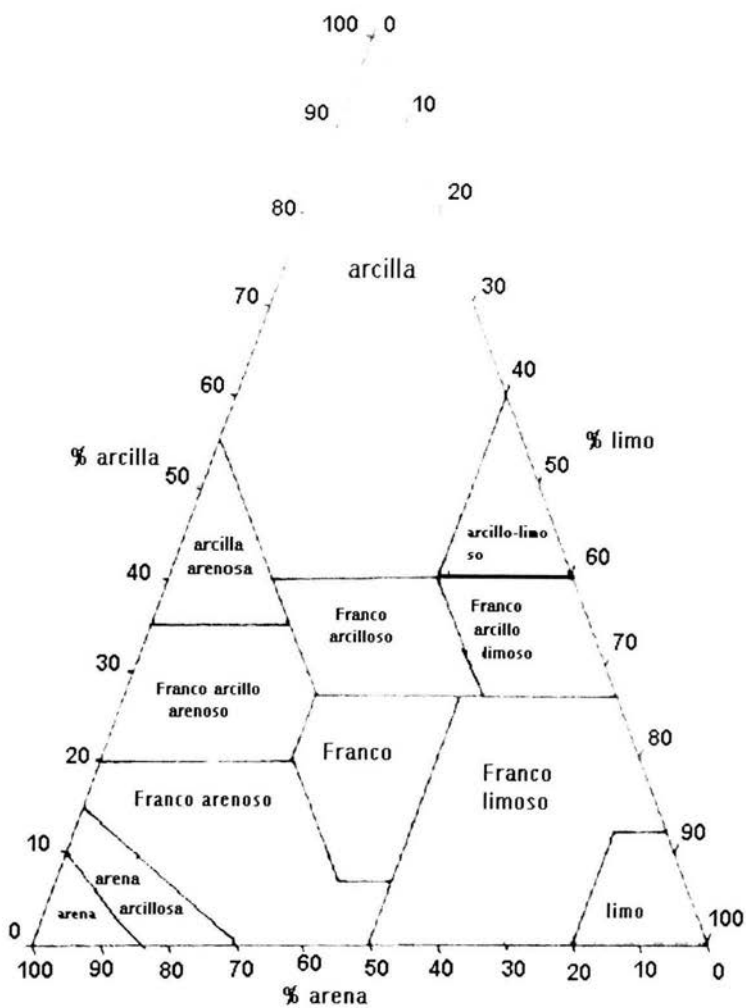


Figura 2. Triangulo textural mostrando el % de arena, sedimento y arcilla en cada clase de textura (De Jeffrey 1987).

Los componentes orgánicos del suelo consisten de ácido humico y sustancias nohumicas. El humus es un material amorfo compuesto de altas cantidades de compuestos aromáticos oxidados y material orgánico polimérico derivado de la degradación de ligninas por actividad microbiana (Hetting, 1993). Las sustancias no humicas consisten de carbohidratos, proteínas, a.a., grasas, ceras, ácidos orgánicos, y alcanos de alto y bajo peso molecular(1).

2.6.4 EFECTO SALINO EN EL CRECIMIENTO DE PLANTAS

Una respuesta inmediata de plantas a elevada salinidad es una disminución en la velocidad de extensión de las hojas. Consecuentemente en plantas enteras el área de la hoja es reducido. De hecho, la disminución en el crecimiento durante el desarrollo inicial en suelos salinos puede ser atribuido a una disminución en el área de la hoja. Ball (1988) encontró que la disminución en el crecimiento en una especie de mangle puede ser atribuida a la disminución en la proporción en el área de la hoja. Incluso aunque la salinidad puede inducir una rápida reducción en el crecimiento de la raíz, la disminución del crecimiento del retoño desminuye más que el crecimiento de la raíz, causando un incremento en la proporción raíz/retoño (73).

2.6.4.1 CLASIFICACION DE LAS PLANTAS EN BASE A SU TOLERANCIA A SALES.

La tolerancia a sales ha sido involucrado en muchos ordenes de plantas vasculares. En general, el termino *halofitas* se refiere a plantas tolerantes a sales. Aunque no es una definición aceptada generalmente la definición de este termino, puede ser usada para clasificar todas las especies de plantas que crecen en suelos salinos con tolerancia a salinidad alta. Unger (1991) define halofitas como todas las especies de plantas que toleran suelos relativamente altos en salinidad y son capaces de acumular cantidades relativamente altas de Na^+ y Cl^- en sus tejidos (Tabla de abajo). Las Glicofitas, por otro

lado, son especies que muestran pequeña tolerancia a salinidad elevada en la zona de la raíz, y no acumulan altas concentraciones de iones en sus tejidos. Las holofitas obligadas alcanzan su crecimiento máximo bajo salinidad moderada y tienen un crecimiento reducido en condiciones de salinidad baja(16,47,69).

TABLA 2 Clasificación y concepto de las plantas en base a su tolerancia a sales.

Clasificación	Concepto
Glicofita	Una planta cuyo crecimiento y salud disminuye cuando es expuesta a cualquier nivel de salinidad mayor que 10mM
Glicofita intolerante	Plantas que no pueden tolerar una salinidad más grande que aproximadamente 10mM
Halofita	Plantas que toleran una salinidad más alta que las glicofitas (por arriba de 50mM) pero después sufren una disminución en el crecimiento y la salud.
Halofita obligada	Plantas que no alcanzan un desarrollo óptimo a bajos niveles de salinidad (menores que 10mM). Requieren una moderadamente alta salinidad (50mM) para alcanzar su nivel de salud más alto.
Halofita facultativa	Plantas que requieren una ambiente moderadamente salino en el suelo o como aerosoles.

2.6.4.2 EFECTOS NOCIVOS DE SALINIDAD

EFECTOS DIRECTOS

1. Actividad enzimática . como una regla, las enzimas son inhibidas por salinidad in vitro igualmente en glicofitas y halofitas (Greenway y Osmond 1972, Greenway y Munns 1980). Aunque las enzimas de las glicofitas y halofitas son igualmente sensibles a salinidad, los efectos de soluciones salinas en suelos en el metabolismo de las plantas varia entre especies iónicas y entre halofitas y glicofitas. En glicofitas, el Na^+ es más toxico que el K^+ , mientras en halofitas, la toxicidad sigue el modeo general: $\text{K}_2\text{SO}_4 > \text{KCl} > \text{Na}_2\text{SO}_4 = \text{NaCl}$ (Edgan y Ungar 1998)
2. Desbalance nutrimental. Las interacciones entre otros nutrientes y la salinidad puede ser medida por los índices de deficiencia nutrimental en el crecimiento de las plantas en condiciones de salinidad alta. Muchos estudios han demostrado que en glicofitas expuestas a salinidad alta existen limitaciones en Potasio, calcio, magnesio, y fósforo (Gorham 1992). El sodio es transportado a través de la membrana por un complejo proteico que lo mueve en una dirección e H^+ en otra dirección (Na^+/H^+ antiporter). La fuente de energía para este sistema antiport es un gradiente de protones establecido a través de la membrana por una bomba H^+ -ATPasa. Esta ATPasa dependiente es inhibida por NaCl.
3. Tarnstorno membranar. Algunos componentes estructurales básicos de la membrana son afectados por salinidad. Comúnmente asociado con un incremento en la salinidad esta un incremento en la vascularización de la membrana plasmática (Flowers et al. 1972) Esto puede ser además un incremento significativo en el retículo endoplasmico. El incremento en vesículas y retículo endoplasmico puede ser un mecanismo de compartimentar o exportar iones Na^+ bajo condiciones salinas, la filtración de la membrana se incrementa en glicofitas, en una relación lineal entre salinidad externa y velocidad de filtración de la membrana (Leopold y Willing 1984). Esta claro que el sodio

reemplaza al calcio en la membrana, y este cambio iónico desequilibra la permeabilidad de la membrana (17,59).

EFFECTOS INDIRECTOS

1. Relación con el agua. El efecto indirecto más observable de salinidad en plantas es la reducción de agua disponible en el suelo, debido a un incremento en la salinidad, la cantidad de agua en el suelo disminuye.
2. Limitación colateral de nutrientes
3. Estrés oxidativo. Diversas características ambientales comunes en hábitats salinos conducen a un incremento en las **Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)** y una inhibición de la función fotosintética. La salinidad se eleva durante periodos calurosos y relativamente secos, debido a estos factores la salinidad se eleva y la disponibilidad de agua es baja causan una reducción en la apertura estomatal. Hábitat salinos están caracterizados por relativamente alta intensidad de luz, la cual en combinación con baja apertura estomatal pueden resultar en la producción de ROS en cloroplastos y mitocondria. Este incremento de ROS en plantas es experimentado en condiciones de salinidad alta (Smirnov 1993). Los ROS se acumulan en los cloroplastos debido a que la luz es un estimulante del flujo de electrones, en la presencia de un suministro limitado de NADP, para aceptar el flujo de electrones a través de las reacciones fotoquímicas (17,59).

2.6.4.3 MECANISMO MOLECULARES DE ADAPTACIÓN A SALINIDAD

Las glicofitas generalmente mantienen homeostasis iónica por exclusión salina, mientras las halofitas acumulan sales como un mecanismo para mantener la homeostasis iónica (Gorham 1994). Un cultivo de maíz tolerante a salinidad transporta Na^+ a las hojas dos veces más que otros cultivos tolerantes (Cramer et al. 1994). El transporte de iones que entran y salen del citoplasma es el factor mayoritario que regula la homeostasis iónica. El

transporte iónico hacia el citoplasma esta determinado por un gradiente electroquímico a través de la membrana celular (membrana plasmática y tonoplasto), proteínas transportadoras y canales iónicos. El citoplasma esta cargado negativamente comparado con el apoplasto, debido a las bombas ATPasas en la membrana plasmática y a las bombas H^+ -asas en el tonoplasto que mueven los H^+ hacia el apoplasto. El sodio y calcio difunden a través de la membrana plasmática hacia la célula basada en el gradiente electroquímico, resultando en concentraciones de cerca de 10 y 0.2mM, respectivamente, en el citoplasma (Bus 1995). Cuando la concentración de Na^+ en el apoplasto es alta, la homeostasis de Na^+ es mantenida por antiporters H^+/Na^+ que acoplan la salida de Na^+ y la entrada de H^+ hacia el citoplasma (Dupont 1992). Los antiportes trabajan junto con las bombas ATPasas regulando el balance electroquímico del citoplasma. Algunas especies tolerantes a sales tales como la cebada incrementan la actividad de los antiporters H^+/Na^+ en solución salina (50,46).

Una importante característica de las halofitas que no tienen glándulas salinas es la gran cantidad de sodio y cloro en hojas y células del parénquima. Esto podría sugerir que muchas halofitas pueden tolerar altas concentraciones de sales en el citoplasma, pero no es el caso. Por ejemplo, Sueda marítima mantienen altas concentraciones de sales en los tejidos, pero la función de enzimas y cloroplastos son inhibidas por sales de manera similar que las glicofitas. Estas especies son capaces de compartimentar iones lejos del citoplasma (Hajibagheri et al. 1984). Los iones pueden ser retenidos en la pared celular, o acumulados en las vacuolas después de difundir a través de las vacuolas de células del parénquima y llegan a estar en equilibrio en apoplasto y simplasto(59).

Diversas líneas de evidencia limitan el término de almacén en las vacuolas como un mecanismo de tolerancia a sales. Primero, la habilidad para concentrar sales en la vacuola esta limitada por el punto donde la concentración vacuolar alcanza la saturación por los transportadores iónicos. Seguido de este punto, todos los iones pueden retenerse en el citoplasma y la concentración citoplásmica se puede elevar muy rápido. Segundo, diversos estudios han mostrado concentraciones equimolares de Na^+ en el citoplasma y la vacuola central en halofitas creciendo en condiciones salinas. Tercero, la concentración vacuolar de

Na^+ y Cl^- sólo exceden concentraciones citoplásmicas en las células de la raíz del maíz cuando se incrementa la salinidad externa a valores que las plantas de maíz no pueden tolerar (Hajibagheri et al. 1987). Además, una fuerte compartimentación hacia el apoplasto puede ser importante para tolerancia salina sólo cuando los niveles salinos se incrementan en los tejidos por encima de los tolerados por el citoplasma.

Los solutos que son compatibles con el citoplasma son acumulados por todos los organismos. Las plantas acumulan estos solutos en respuesta a baja disponibilidad de agua, baja temperatura, y salinidad (Bohnert et al. 1995). Tanto halofitas como glicofitas acumulan un número diferente de solutos en el citoplasma cuando experimentan condiciones salinas. La acumulación de solutos compatibles con el citoplasma no pueden ser el único método de ajuste osmótico de las plantas en condiciones hipersalinas. Además los iones inorgánicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) y solutos orgánicos están involucrados en el ajuste osmótico de halofitas. La acumulación de solutos orgánicos en condiciones hipersalinas ocurre en respuesta a los efectos osmóticos del suelo y no es una respuesta específica de iones (59).

3. NUTRICION VEGETAL

3.1. CONCEPTO Y CLASIFICACION DE LOS NUTRIENTES

La nutrición mineral tienen funciones específicas y esenciales en el metabolismo de las plantas. Dependiendo del requerimiento de un nutriente dado, los nutrientes son referidos como *macronutrientes* y *micronutrientes*. Un nutriente mineral puede funcionar como un constituyente de una estructura orgánica, como un activador de una reacción enzimática, o como un osmorregulador o transportador de carga. Otra clasificación, basada en propiedades fisicoquímicas, divide a los nutrientes, en metales (potasio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, zinc, cobre, molibdeno) y no metales (nitrógeno, azufre, fósforo, boro, cloro). Ambas clasificaciones son inadecuadas puesto que cada nutriente mineral puede realizar una variedad de funciones, y algunas de estas funciones son sólo flojamente correlacionadas a la cantidad de requerimiento o propiedades fisicoquímicas(59).

3.2. FUNCION DE LOS NUTRIENTES MINERALES: MACRONITRIENTES

Las funciones principales de los nutrientes minerales tales como el nitrógeno, azufre, y fósforo es que sirven como constituyentes de proteínas y ácidos nucleicos. El nitrógeno y azufre son constituyentes integrales de proteínas estructurales y de apoenzimas (59).

3.2.1 NITRÓGENO

El nitrógeno es un factor de crecimiento limitante para muchas cosechas. Más del 90% del nitrógeno en el suelo es nitrógeno enlazado orgánicamente, el cual llega a ser disponible para las plantas después de mineralización por microorganismos. La cantidad total de nitrógeno en el suelo disponible para las plantas esta además estrechamente relacionado con le contenido de materia orgánica y las condiciones de mineralización. Siendo el pH sólo de menor importancia por los niveles de pérdida de nitrógeno en suelos alcalinos(1).

3.2.1.1. ASIMILACIÓN Y FIJACIÓN DE NITRÓGENO

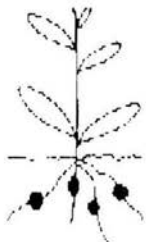
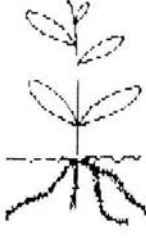
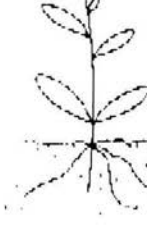
La capacidad de fijación biológica de nitrógeno atmosférico (N_2) esta restringida a organismos procarióticos, es decir, bacterias y algas verde azules (Cianobacterias).

Se conocen tres estrategias de fijación de nitrógeno en ecosistemas terrestres, simbiótico, asociativo y organismos de vida libre que fijan nitrógeno. En promedio, los sistemas simbióticos tienen la mas alta capacidad de fijación ya que la energía no sólo es provista de los carbohidratos, sino además de otras condiciones. En estos sistemas las plantas se benefician directamente ya que más del 90% de nitrógeno fijado es rápidamente translocado de la bacteria a la planta(31,40).

Algunos sistema fijadores de N_2 con alta especificidad hospedero-bacteria no desarrollan nódulos. El hábitat de estas bacterias es la interfase y espacios intracelulares de la corteza. En esta rhizosfera la planta hospedero, tiene un beneficio indirecto de fijación de nitrógeno del 90% siendo disponible para ella sólo después de que la bacteria muere(39,59)

Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre son la mayoría heterotrópicas, de esta manera restringen su capacidad para fijar nitrógeno por la limitación de sustrato debido a una inadecuada disponibilidad de residuos orgánicos. Como consecuencia, su contribución a la fijación de nitrógeno a ecosistemas terrestres es pequeña. En promedio la contribución relativa de sistemas simbióticos, asociados y de vida libre es del orden de 70% en simbióticos y 30% no simbióticos (Tabla 3)(23.63).

Tabla No. 3 Sistemas de fijación de nitrógeno (Modificado por K. Iserman, 60)

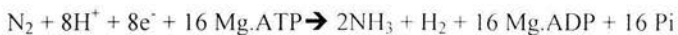
Sistemas de fijación de N₂ $(N_2 \rightarrow NH_3)$ y microorganismos involucrados				
	Simbiosis (Ej. <i>Rhizobium</i> , <i>Actinomicetes</i>)	Asociaciones (Ej. <i>Azospirillum</i> , <i>Azetobacter</i>)	Vida libre (Ej. <i>Azetobacter</i> , <i>Klebsiella</i>)	
Fuentes de energía (carbón orgánico)	Sacarosa y metabolitos de la planta huésped	Exudado de la raíz de la planta huésped	Heterótrofa: Residuos de la planta	Autótrofa: fotosíntesis
Estimación de cantidades fijadas Kg. N ha⁻¹	Legumbres 50-400 Legumbres no noduladas: 20-300	10-200	1-2	10-80

El nitrato y amonio son la mejores fuentes de nitrógeno inorgánico tomadas por las raíces de plantas superiores. Mucho del amonio ha sido incorporado hacia compuestos orgánicos en las raíces, mientras el nitrato es rápidamente movido en el xilema y puede además ser almacenado en las vacuolas de las raíces, y órganos almacenadores. La acumulación de nitrato en las vacuolas puede ser de considerable importancia para el balance catión-anión,

para osmoregulación, particularmente en especies bien llamadas nitrofilicas tales como *Urtica dioica* y *Chenopodium album* (64) y para la calidad de vegetales y plantas de forraje. La importancia de la reducción y asimilación de nitrato para la vida de las plantas es similar a la reducción y asimilación de CO₂ en la fotosíntesis.

La reducción bioquímica de N₂ a NH₃ es un proceso endergónico con un requerimiento mínimo de energía (960kJ mol⁻¹)(48).

El complejo referido como nitrogenasa, es único para microorganismos fijadores de nitrógeno, y ha sido encontrado en cianobacterias, bacterias anaeróbicas y los nódulos de las raíces de las legumbres y las no legumbres. Esta consiste de dos proteínas oxígeno sensibles. La mas pequeña de las dos proteínas es referida como una Fe-proteína, la más grande como MoFe-proteína. Para que se lleve acabo la reacción de la nitrogenasa, se requiere de ATP y equivalentes reductores (electrones), administrado por la respiración y los transportadores de electrones, usualmente ferredoxina. La nitrogenasa cataliza la reacción de diversos substratos incluidos H⁺, N₂ y C₂H₂. La reacción principal es como sigue:



3.2.1.2. REDUCCIÓN Y ASIMILACIÓN DE NITRATO Y OSMORREGULACIÓN.

Mecanismo. La reducción de nitrato en plantas superiores como en plantas inferiores sigue la reacción:



Algunas bacterias utilizan el nitrato como aceptor de electrones bajo condiciones anaeróbicas y producen gases nitrogenosos (N₂, N₂O Y NO_x), un proceso el cual causa considerable perdida de nitrógeno combinado del suelo por denitrificación. La reducción de nitrato a amonio es mediada por dos enzimas: nitrato reductasa (NR) la cual involucra la reducción de dos electrones de nitrato a nitrito, y la nitrato reductasa (NiR) la cual transforma el nitrato a amonio en una reducción de seis electrones(Fig No. 3).

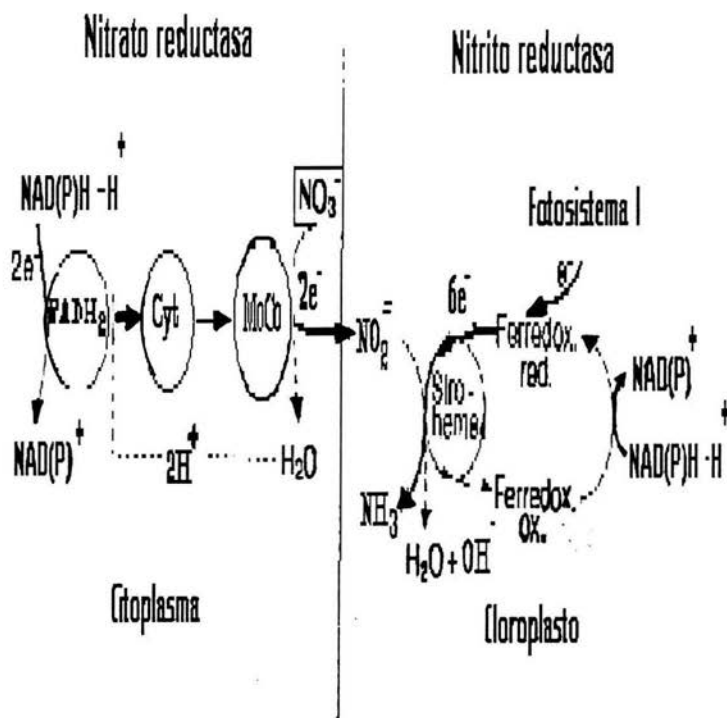


Fig.3 Representación esquemática de la secuencia de asimilación de nitrato en las células de las hojas (Basado en Reervers y Hageman, 1983; y Warnwe y Kleinhofs, 1992).

Toda la asimilación de nitrato ocurre en los retoños, los ácidos orgánicos aniónicos son sintetizados en el citoplasma y almacenados en las vacuolas en orden para mantener un balance anión-catión y el pH intracelular (58,59).

Existen diversos mecanismos para la remoción del exceso de solutos del tejido retoño:

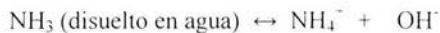
1.- Precipitación de solutos en exceso en una forma inactiva osmoticamente. Síntesis de ácido oxálico para compensar la carga en la reducción de nitrato y precipitar como oxalato de calcio.

2.- Retranslocación del nitrógeno reducido (amino ácidos y amidas) junto con cationes móviles en el floema, tales como potasio y magnesio, a las áreas de nuevo crecimiento.

3.- Retranslocación de aniones orgánicos, preferentemente malato, junto con potasio hacia las raíces y la liberación de un anión (OH^- o HCO_3^-) después de la descarboxilación (59,74,75).

3.2.1.3. ASIMILACIÓN DE AMONIO

Mientras el nitrato puede ser almacenado en vacuolas sin efectos dañinos, el amonio está en equilibrio con su pareja el amoniaco



Son tóxicos a pequeñas concentraciones. La formación de amino ácidos, amidas y la liberación de compuestos es el principal camino de destoxificación de los iones amonio tomados por las raíces o amoniaco derivados de la reducción de nitrato o la fijación de N_2 . Uno de los principales pasos en la asimilación del ión amonio suministrado a las raíces es la captura hacia las células de las raíces e incorporación hacia amino ácidos y amidas con una simultánea liberación de protones por compensación de cargas (58,59).

Todo el amoniaco asimilado es translocado a los retoños como amino ácido, amidas y compuestos relacionados para su futura utilización. Lo mismo sucede con las raíces

asimilando amoníaco de la reducción de nitrato o la fijación de N_2 . Esta transportación de las raíces a los retoños del amoníaco asimilado toma lugar predominantemente o exclusivamente en el Xylem(58).

La asimilación de amonio en raíces además tiene un gran requerimiento de esqueletos de carbono para síntesis de amino ácidos. Estos esqueletos de carbono son proporcionados por el ciclo de ácido tricarboxílico (TCA), y la remoción de intermediarios tiene que ser llenada por el incremento en la actividad de PEP carboxilasa (Fig. No. 4) (61).

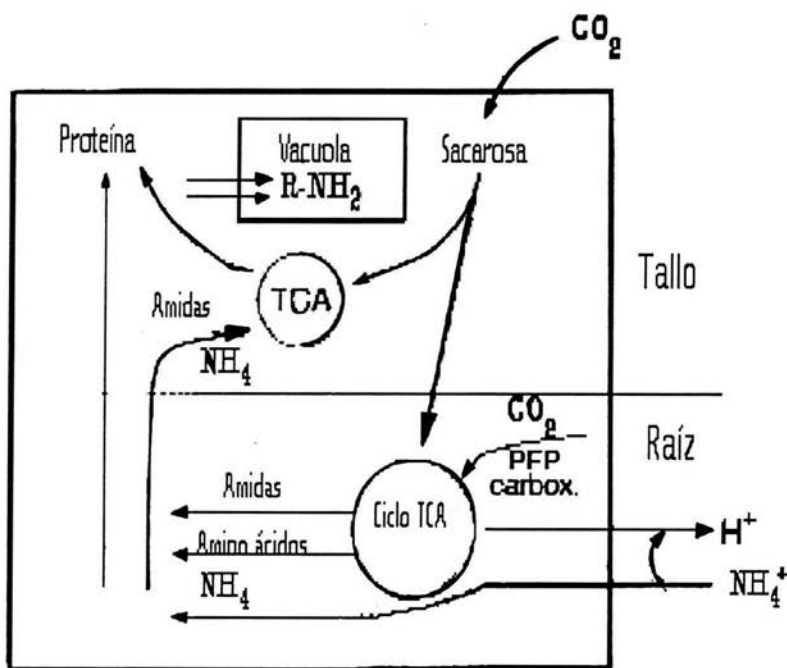


Fig. 4 Modelo de asimilación de amoníaco en raíces (Rave , 1986)

No obstante los diferentes sitios de asimilación de amoníaco (raíces, nódulos de las raíz y hojas) las enzimas clave involucradas son en cada caso glutamina sintetasa y glutamato sintetasa. Ambas enzimas se encuentran en raíces, cloroplastos y microorganismos fijadores de N_2 , y existe evidencia convincente de que la asimilación de mucho si no es que todo el amoníaco deriva del amonio captado, fijación de N_2 (Bothe et al., 1983), la reducción de nitrato y fotorrespiración mediado por la ruta de la glutamato sintetasa(58).

En esta ruta el amino ácido glutamato actúa como el aceptor para amoníaco, y se forma glutamina. La glutamina sintetasa tiene una muy alta afinidad por el amoníaco y de esta manera es capaz de incorporar amoníaco incluso si la concentración presente es muy baja. La toxicidad del amoníaco puede ser relacionada a la rápida infiltración de amoníaco a través de las membranas. Por ejemplo el amoníaco pero no el amonio (NH_4^+), difunde rápidamente a través de las otras membranas de los cloroplastos (58, 59).

La otra enzima en la asimilación de amoníaco, glutamato sintetasa (GOGAT), cataliza la transferencia del grupo amino ($-NH_2$) de glutamina a 2-oxoglutarato, siendo éste último un producto del ciclo del ácido tricarboxílico. Para esta reacción es necesario la ferredoxina reducida (del fotosistema I) o el NAD(P)H (de la respiración). El resultado de la reacción es la formación de dos moléculas de glutamato, una de las cuales es requerida para mantener la asimilación de amoníaco y la otra la cual puede ser utilizada para la biosíntesis de proteínas (Fig. 5)(58).

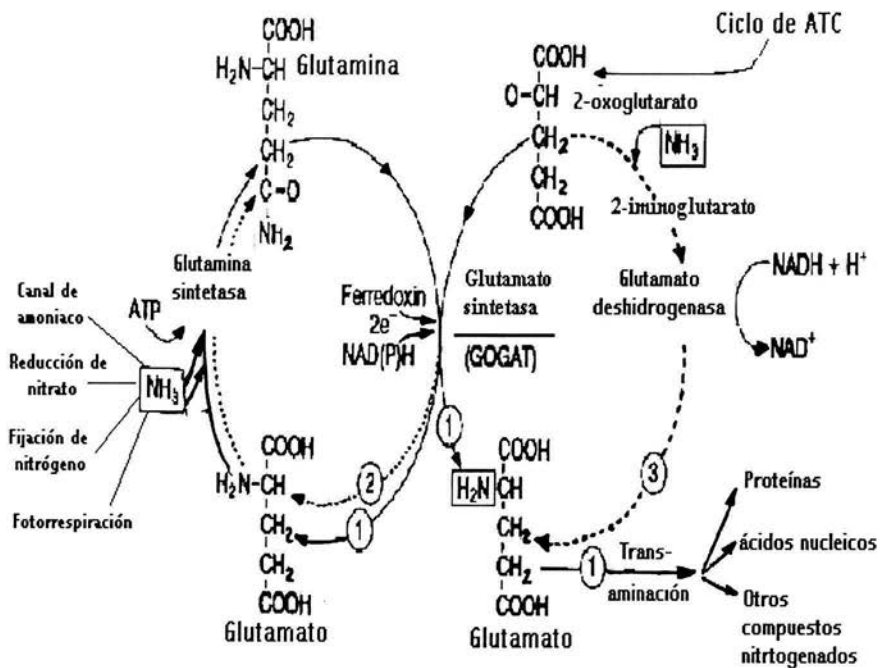


Fig. 5 Principales rutas metabólicas involucradas en la asimilación de amoníaco en raíces y hojas (59).

3.2.1.4. LOCALIZACIÓN EN EL RETOÑO Y LAS RAICES.

En muchas especies de plantas las raíces y los retoños son capaces de reducir nitrato. La proporción de reducción acarreada fuera en cada localización depende de varios factores, incluyendo el nivel de nitrato administrado, la especie de planta, y la edad de la planta teniendo consecuencias importantes para la nutrición mineral y la economía del carbono de la planta. En general, cuando el suministro de nitrato externo es bajo, una alta proporción de nitrato es reducido en las raíces. Con un incremento de nitrato suministrado, la capacidad para reducir el nitrato en las raíces llega a ser un factor limitante y un incremento en la proporción de el nitrógeno total es translocado a los retoños en forma de nitrato(31.58).

En hojas pero, no en raíces, la reducción de nitrato y la reducción de CO₂ compiten por reductores y ATP para la fotosíntesis. En una especie dada la proporción de nitrato reducido en las raíces se incrementa con la temperatura (Theodorides y Pearson, 1982) y la edad de la planta (Hunter et al., 1982). La velocidad de captación del catión acompañante además afecta esta proporción. Con potasio como catión acompañante, la translocación de nitrato a el retoño es rápida; correspondientemente, la reducción de nitrato en las raíces es relativamente baja. En contraste, cuando calcio o sodio son los cationes acompañante, la reducción de nitrato en las raíces es considerablemente más alta (71).

En las células individuales el nitrato es almacenado casi exclusivamente en las vacuolas (Martinoia et al., 1981). La liberación de nitrato de la vacuola hacia el citoplasma puede llegar a ser un paso limitante para la reducción del nitrato (Martín, 1973; Rufty et al., 1982) y de esta manera para la utilización del nitrógeno almacenado del nitrato en el proceso de crecimiento (Clement et al., 1979). La interrupción del suministro de nitrato a las raíces puede además conducir a un caída en la actividad de la nitrato reductasa en las hojas y a la velocidad de crecimiento del retoño, no obstante existe un alto contenido de nitrato en el retoño (59.71)

3.2.1.5. BIOSÍNTESIS DE PROTEINAS

Las proteínas en los granos de cereal maduro son cerca del 8-15%. Las proteínas en los granos tienen efectos importantes en la calidad nutricional de los animales monogástricos (ej. puercos, aves de corral, y humanos).

El estudio de las proteínas de granos de cereales empezó en la mitad del siglo XVIII, cuando Becari (1975) reportó el aislamiento y caracterización del gluten de trigo. Osborne pionero en el estudio sistemático de proteínas de plantas e introdujo la clasificación más usada hacia grupos solubles ("fracciones Osborne") basadas en su extracción secuencial en agua (albúminas), soluciones salinas diluidas (globulinas), mezclas de alcohol-agua (prolaminas) y ácidos diluidos y álcalis (gluteínas).(3).

El enlace original del nitrógeno del glutamato y glutamina pueden ser utilizados para la síntesis de otras amidas, o bien de ureidos, amino ácidos y compuestos de alto peso molecular como las proteínas. El esqueleto de carbono de estos distintos amino ácidos son derivados principalmente de intermediarios de fotosíntesis (3-fosfoglicerato), glicólisis (3-fosfoglicerato y piruvato) y del ciclo del ácido tricarbólico (oxaloacetato y 2-oxoglutarato). La transferencia de un grupo amino de los amino ácido a otro esqueleto de carbono – la reacción de transaminación- es catalizada por aminotransferasas(58).

3.2.1.5.1 PROTEINAS DE RESERVA.

Las proteínas de reserva son un grupo que comprende proteínas generadas principalmente durante la producción y reserva en los granos que sirven como fuentes de nitrógeno para el desarrollo del embrión durante la germinación. El contenido promedio de proteína de granos de cereales es 10-15% de su peso seco, en granos de leguminosas 20-25%, mientras que sólo un 3-5% se encuentran en las hojas normales. Las proteínas de reserva se encuentran también en raíces y retoños de algunos tubérculos(3).

El concepto de proteínas de reserva no es clara. El término es operacional y fue coincido para todas las proteínas cuyo interés en la cantidad total de proteína de la célula es más grande que el 5%. Usualmente, se pueden encontrar las siguientes características:

- No tienen actividad enzimática
- Sirven como fuente de nitrógeno para la germinación de granos
- Se encuentran generalmente cuando existe un estado de agregación dentro de la membrana rodeada por vesículas (cuerpos proteicos)
- Están comúnmente construidas por un número diferente de cadenas polipeptídicas.

Quizá la propiedad más crítica de una proteína de reserva es que son sintetizadas y acumuladas dentro de la célula de un grano en desarrollo y fuera son degradadas y re sintetizadas a proteínas metabólicas como enzima y proteínas membranales. Durante la germinación esta proteínas pueden romperse a sus amino ácidos constituyentes(3,27).

La estrategia para removilizar las proteínas de almacén durante la germinación difieren entre legumbres y cereales. Esto refleja el hecho que las células del endospermo y las de los cotiledones siguen rutas diferentes durante el desarrollo de los granos. En cereales, el endosperma es esencial en la muerte del tejido. En la germinación, las hidrolasas, las cuales son sintetizadas en la células alrededor de la capa del aleurona, difunde hacia el endospermo. Las proteínas de reserva son degradadas y los amino ácidos difunden a través del escutelum a el embrión (marcus y Rodaway, 1982). Este ciclo de acumulación selectiva de las proteínas de reserva durante la formación de los granos y la hidrólisis selectiva durante la germinación es central para el funcionamiento fisiológico apropiado de una proteína de reserva(3,11)

Toda la evidencia es consistente con la noción de que las proteínas de reserva son sintetizadas en el retículo endoplásmico y transportadas por vía lumen del reticulo endoplásmico (Higgins y Spencer 1981), y en algunos casos por el aparato de Golgi (Chrispeels, 1983), hacia su sitio de depósito en los cuerpos de proteínas o en vacuolas proteicas(28).

3.2.1.5.1.1 LEGUMINA.

Es una de las dos mayores globulinas en los granos de guisantes y otras legumbres, junto con la fracción de vicilina, estas forman cerca del 70% del total de proteína. Estudios han mostrado que se encuentran tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Estas moléculas son polímeros de peso molecular alrededor de 300,000 a 400,000 Da. Estas son típicamente construidas de dos subunidades, los polipéptidos ácidos y los básicos. La estructura cuaternaria esta compuesta de seis polipéptidos básicos (PMr 20000 Da) y seis ácidos (PMr 40000 Da) unidos por enlaces disulfuro(3.31).

Extractos de proteínas de cotiledones intactos durante la maduración de guisantes muestran que la subunidad de las proteínas almacenadas en los granos (legumina), son las primeras en ser sintetizadas como una familia de grandes moléculas precursoras PMr 60000 a 65000 Da. Bajo condiciones normales estos precursores son procesados para formar el componente de PMr 40000 y 19000 Da (27,31).

Procesamiento. La preprolegumina es el producto de la traducción primaria y completa. Posee una secuencia N-terminal que es transitoria pero necesaria para el transporte a través de la membrana. Posteriormente se forma un enlace disulfuro y la prolegumina es formada. La cadena polipeptidica esta dividida en dos cadenas una α y una β . Estas permanecen juntas debido al enlace disulfuro generando la legumina madura (Fig. 6)(11).

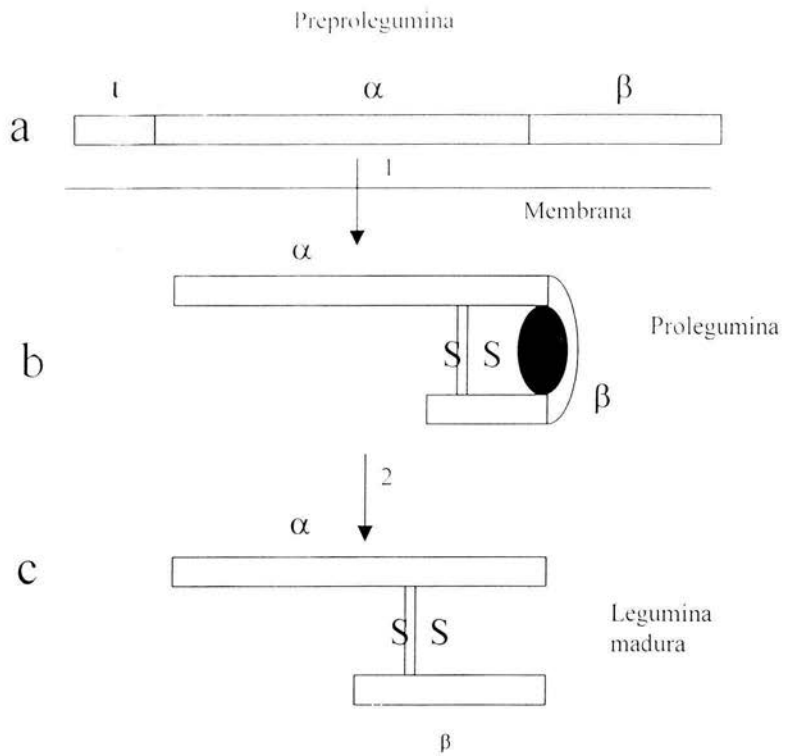


Fig 6. Modelo de maduración de Legumina.

En estudios previos se demostró que la subunidad más pequeña de legumina presente en granos maduros (PMr 20000 Da) esta formada vía un polipéptido de PMr 19000 Da. (31,36).

3.2.1.5.1.2 VICILINA

Son glicoproteínas con 1-5% de residuos de azúcares neutros. Están constituidas de diversas cadenas polipeptídicas que están unidas por una estructura cuaternaria(3).

Vicilina es una de las dos proteínas de reserva las cuales son acumuladas en grandes cantidades durante la formación de granos en guisantes (*Pisum sativum*). La fracción es un complejo de cinco proteínas estrechamente relacionadas. Estas proteínas están formadas de proporciones variables de un gran número de polipéptidos con peso molecular entre los 12000 a 75000 Da. Bajo condiciones donde la glicosilación esta inhibida por tunicamicina el polipéptido PMr 14000 Da de las proteínas de reserva de vicilina no es sintetizado pero existe un incremento y la acumulación del polipéptido de PMr 12000 Da, indicando que el polipéptido de PMr 14000 y 12000 Da de vicilina representan la forma glicosilada y no glicosilada respectivamente(28).

La traducción inicial de polipéptidos de vicilina son moléculas de 75 kDa, 70 kDa y una familia estrechamente relacionada de un polipéptido de 50 kDa (Higgins y Spencer, 1981; Croy et al., 1980). Estos son ensamblados hacia oligomeros en la proteína de tamaño (7S) dentro del lumen del reticulo endoplasmico y transportados a los cuerpos de proteínas en esta forma (Chrispeels et al. 1982). Esto sólo después de la deposición de los oligómeros de vicilina en los cuerpos proteicos sufriendo una división endoproteolítica para producir las siete subunidades características de vicilina "madura". Esto ocurre pasado un periodo de 6 a 20 h después de la síntesis del polipéptido (Chripeels et al., 1982b). Es interesante que la secuencia de amino ácidos de la subunidad α' de β -conglycina de guisante (Schuler et al., 1982) y la subunidad de 50kDa de vicilina (Chandler et al., 1983) muestran estrecha

secuencia de amino ácidos, excepto en dos regiones específicas que se ha encontrado son los sitios de la ruptura endoproteolítica en vicilina(12,3).

3.2.1.5.1.3 PROLAMINAS.

Son las proteínas de reserva en gramíneas, y están caracterizadas por una alta proporción de prolina y glutamina, además de ser solubles en alcohol.(5)

Entre las mejor conocidas prolaminas están las zeínas, las proteínas de almacenaje de maíz. Estas toman cerca del 50% del total de contenido de proteína del endospermo. Las zeínas son cadenas de polipéptidos con pesos moleculares de 10000, 14-16000, 19000, 22000, y 27000Da. Las cadenas de 19000 y 22000 Da consisten de secuencias de amino ácidos similares, además de ser pobres en lisina y triptofano siendo con ello de bajo valor para la nutrición humana (5).

Contrario a los genes de las proteínas de reserva de leguminosas, los genes de las prolaminas no contienen intrones, cada gen consiste de una cadena de DNA traducible. La comparación de la secuencia de amino ácidos, deducido de cDNAs clonado y genes, han sido clasificados en cuatro grupos llamados α , β , γ y δ zeínas (12).

Las α -zeínas son cuantitativamente los componentes mayoritarios e incluye la banda de PM 19 y 22.000. Del total de la fracción el 75-80% consiste de un componente monomérico y oligomérico. El péptido de 19.000 consiste de 210-220 residuos y el de 22000 de 240-250 residuos(3).

Las zeínas de PM 19000 y 22000 Da tienen estructuras similares, consisten de un dominio corto único en el amino terminal (36-37 residuos) y carboxilo terminal (10 residuos) al lado de un dominio repetitivo. Las proteínas tienen cerca de 20 mol % Gln, 10% mol de Pro, y uno o dos residuos de cisteína por mol. La diferencia de tamaño entre el Mr 19000 Da y Mr 20000 Da zeínas han sido interpretado como una unidad adicional repetida del carbonilo

terminal final del dominio repetitivo en el componente Mr 22,000, o una inserción en el dominio carbonilo terminal para formar una región doblada (3.39)

El análisis genético ha mostrado que las α -zeinas son controladas por múltiples loci en los cromosomas 4 y 7, y un locus en el cromosoma 10 (3.5).

Las β -zeinas consisten de 10-15% del total de proteína y consiste de las bandas Mr 14000 a 16000 Da. Dos cDNAs y un gen para β -zeinas se han observado codifican proteínas maduras de cerca de 160 residuos (Marks et al., 1985; Pedersen et al., 1986). Estos son sintetizados con 19 péptidos señal y no hay evidencia de secuencias repetidas. Son usualmente ricas en cisteína (cerca de 4 mol%) y metionina (cerca de 11 mol%), los últimos son agrupados en una zona hacia el carbonilo terminal de la proteína β -zeina son sólo extraídas bajo condiciones reductoras, indicando que algunos residuos de cisteína están involucrados en enlaces disulfuro intercadenas(3).

Las γ -zeinas consisten del 5-10% del total de proteínas, y consisten principalmente de la proteína de Mr 28000 Da. Estas sólo se pueden extraer bajo condiciones reductoras, y bajo estas condiciones son muy solubles en agua. Diversos cDNAs han sido aislados, muchos de los cuales codifican proteínas de 204 residuos (Prat et al., 1987). Las proteínas maduras tienen un claro dominio, con un corto dominio amino terminal (11 residuos) seguido por repeticiones (48 residuos) y un dominio carbonilo terminal (156 residuos). En muchas γ -zeinas la región repetida consiste de ocho hexapeptidos conservados (PPPVHL), pero sólo un cDNA ha sido aislado que codifica a γ -zeinas de 164 residuos y ha mostrado dos completos hexapeptidos y dos hexapeptidos completos (Prat et al., 1987). El dominio carbonilo terminal contiene una región Pro-x (con prolina cada segunda posición) y una región rica en cisteína (cerca de 7% mol)(3.39,58).

δ -zeína es cuantitativamente el componente minoritario que sólo se extrae bajo condiciones reductoras. La proteína madura consiste de 129 residuos, pero esta es sintetizada con un péptido señal de 21 residuos (Kirihiro et al., 1988). Muchos de los residuos de metionina

están presentes en una región central, principalmente como doble Met-Met.. Esto no es evidencia de homología con otras prolaminas, pero Kirihara et al., (1988) reportan una región corta (4 residuos) de secuencia idéntica con la 2S albúmina rica en metionina de nueces de Brasil(3)

3.2.1.5.1.4 RELACION EVOLUTIVA DE LAS PROLAMINAS

Comparación del dominio carbonilo terminal de un número de prolaminas ricas en azufre muestran la presencia de tres regiones conservadas (llamadas A, B, C) separadas por secuencias que muestran pequeña o ninguna similitud entre las diferentes familias de prolaminas ricas en azufre. Amplias comparaciones muestran que las regiones relacionadas para A, B y C están además presentes en dos grupos de proteínas de los granos. Las primeras son un grupo inhibidor de la α -amilasa y tripsina. Consiste de cadenas polipeptídicas de 120-130 residuos, con M_r s de 13000-14000 Da (García-Olmedo et al., 1987). El segundo grupo de proteínas es las albúminas 2S de reserva.. Estas son un grupo pequeño de subunidades de M_r terminal 3000-5000 Da correspondiente a la región A, y una gran subunidad de M_r 7000-9000 Da correspondiente a la región B y C(3).

3.2.1.5.1.5 GLOBULINAS.

Este grupo incluye proteínas que están relacionadas estructuralmente a la 11S (legumina) y 7s (vicilina) proteínas de reserva en legumbres y muchas otras plantas no gramíneas.

11/12S Globulinas

Dos proteínas de este tipo están caracterizadas en detalle. En avena la proteína de reserva mayoritaria es una globulina con un $S_{20,w}$ y un peso molecular de 322,000 Da. Esta consiste de seis subunidades γ (M_r 21700 Da) y seis subunidades β (M_r 31700 Da) (Peterson, 1978). Esto fue confirmado por un análisis de cDNA que predijo un péptido de 24 residuos seguido por un polipéptido ácido y uno básico de 293 residuos (M_r 33100Da) y

201 residuos (Mr 22700 Da) respectivamente (Shotwell et al., 1988). Estudios tempranos demostraron la presencia de pares de enlaces disulfuro en las subunidades de Ms de 36000 y 22000 Da. Este péptido mostró homología con la subunidad de legumina de guisante Mr 22000 Da (Zhao et al., 1983). Takaiwa y Oono, 1991 demostraron que los pares individuales (M_r s 37-39.000 y 22-23.000 Da) son sintetizados por un precursor de Mr 57000 Da el cual es dividido postraduccionalmente(3).

7S Globulinas

Mientras las globulinas 11/12S son el componente mayoritario en el endospermo, las globulinas 7S son sintetizadas primariamente en el embrión y la capa del aleurona.

Kriz y colaboradores aislaron cDNAs para la globulina mayoritaria Mr 63,000 (GBB1) y Mr 45000 Da (GBL2) que juntas forman del 10-20% del total de proteína madura en embriones de maíz (Bleanger y Kriz, 1989; Wallace y Kriz, 1991). Ambas proteínas son sintetizadas por péptidos señal y muestran homología con la 7S globulina de leugumina.

Las globulinas γ_1 tienen un Mr de 20000 Da y consisten de 10 cadenas polipeptídicas, mientras las globulinas γ_3 tienen un Mr de 120.000 Da y consisten de tres cadenas idénticas de Mr 35000 Da y una cadena de Mr 13000 Da(3).

Quatrano et al. (1986) mostrarón que las globulinas del aleurona de trigo tienen bandas (Mr 55000, 38000, y 14000 Da) que se entrecruzan con los anticuerpos de vicilina, mostraron que la proteína es codificada por un gen homologo con el de guisantes de legumina. Yupsanis et al- (1990) purificaron una globulina 7S mayoritaria de cebada, la cual consiste de las sunidades Mr 50000, 40000, 25000, y 20000 Da(3,16).

Con algunas excepciones las proteínas de reserva son sintetizadas en el RE rugoso, con péptidos señal que dirigen la síntesis de nuevos polipéptidos hacia el lumen del RE en donde son degradados proteolíticamente. El lumen del RE es presumiblemente el sitio de plegamiento proteico y formación de los enlaces disulfuro, lo cual puede ser asistido por

chaperoninas moleculares y la enzima **Proteína Isomerasa Disulfuro (PDI)** respectivamente. Ciertamente la actividad de PDI (Roden et al., 1982) y proteínas antigénicas relacionadas a BiP (una chaperonina molecular) (Rubin et al., 1992) están asociadas con el RE en el desarrollo del endospermo en trigo, pero aun no ha sido demostrado su papel en el plegamiento y ensamble de proteínas(3).

La síntesis de globulinas de reserva ha sido estudiado en legumbres ampliamente, mientras las proteínas son transportadas del RE vía el Golgi hacia las vacuolas, los cuales se fragmentan para formar los cuerpos proteicos (Craig, 1988). Estos compartimientos son los sitios para modificaciones postraduccionales específicos (Chrispeels, 1984) que incluye glicosilación inicial en el RE, desglicosilación y glicosilación específica en el Golgi, y además de desglicosilación y proteólisis en los cuerpos proteicos, la proteólisis de 7S y 11S ocurre para dar subunidades individuales(3.58).

La situación es más simple en el endospermo de maíz, donde los cuerpos proteicos contiene únicamente prolaminas y son formadas por deposición directa dentro del RE (Karkins y Hurkman, 1978).

3.2.1.7. COMPUESTOS NITROGENADOS DE BAJO PESO MOLECULAR.

En plantas superiores los compuestos nitrogenados de bajo peso molecular no solo actúan como intermediarios entre la asimilación de nitrógeno inorgánico y la síntesis de compuestos de alto peso molecular. Son además importantes para la economía del nitrógeno en otras estaciones. En contraste con las plantas inferiores, animales y el ser humano, las plantas superiores no son capaces de excretar cantidades substanciales de nitrógeno orgánico enlazado, por ejemplo, urea. Ellas tiene para almacenar este nitrógeno en forma no toxica, por ejemplo, como derivados de urea tales como la alantoína(59).

Compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular son precursores en la síntesis de aminas, los cuales están mediados, por ejemplo, por la descarboxilación de un amino ácido(58).

Las aminas son componentes de la fracción lipídica de biomembranas; la amina que compone al etanol amina, por ejemplo, es sintetizada por descarboxilación de el amino ácido serina. Di- y poliaminas han llamado la atención como mensajeros secundarios en la acción de fitohormonas. La acumulación de di- y poliaminas bajo condiciones de deficiencia de potasio está estrechamente relacionado con nutrición de amonio(43).

Otro compuesto de bajo peso molecular importante para estabilización de estructuras celulares y osmorregulación es la betaina. Bajo estrés salino o sequía, la síntesis de betaina y su acumulación particularmente en el citoplasma se aumenta enormemente donde esta actúa como soluto compatible para neutralizar la perturbación osmótica causada por concentraciones vacuolares altas de iones inorgánicos tales como cloruro y sodio, los cuales son incompatibles con el metabolismo citoplásmico(58).

3.2.1.8 SUMINISTRO DE NITRÓGENO, CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN DE LA PLANTA

Cuando el suministro de nitrógeno es subóptimo, el crecimiento se retarda, el nitrógeno es inmovilizado en hojas maduras y retranslocado a áreas de nueva crecimiento. Los síntomas típicos por la deficiencia de nitrógeno son la presencia de hojas más viejas. Un incremento en el suministro de nitrógeno no sólo retrasa y estimula el crecimiento sino además cambia la morfología de la planta de una manera típica, particularmente si el nitrógeno disponible es alto alrededor de las raíces durante la etapa temprana de crecimiento (Fig. 7).

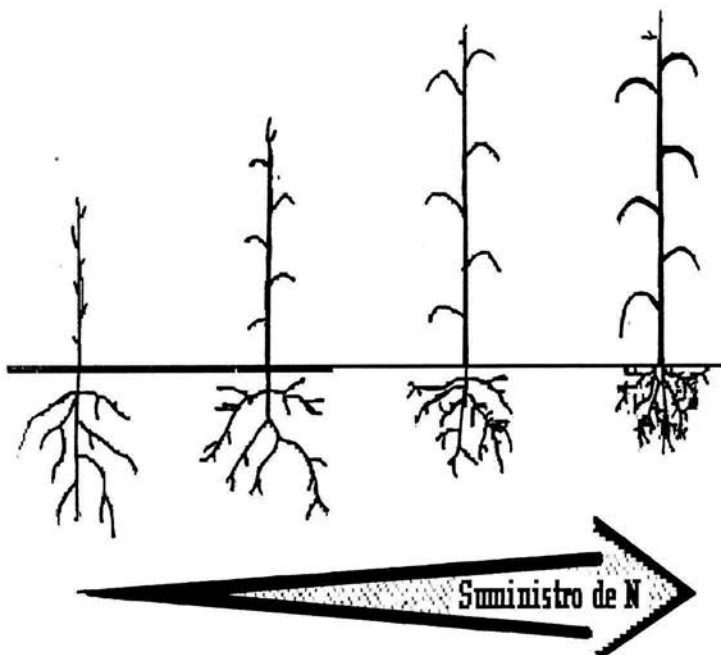


Fig 7. Representación esquemática del efecto del aumento en el suministro de nitrógeno, sobre las raíces durante las etapas tempranas de desarrollo de la planta. (60)

El cambio en la composición de la planta con un incremento en el suministro de nitrógeno refleja una competición por fotosintatos entre las diferentes rutas metabólicas. Esta competición esta modulada por factores internos y externos. Cuando el suministro de nitrógeno es subóptimo, la asimilación de amoníaco incrementa tanto el contenido de proteína y el crecimiento de las hojas y el correspondiente Índice de Área en la Hoja (IAH). Entre más aumentado este el IAH esta correlacionado con un incremento en la fotosíntesis, el requerimiento de esqueletos de carbono por asimilación de amoníaco no suprime substancialmente otra ruta metabólica relacionada a carbohidratos, almacen de lípidos o aceites (59,68).

El contenido de lípidos en hojas verdes esta estrechamente relacionado al suministro de nitrógeno (Beringer, 1966). En hojas la mayoría de los lípidos son galactolípidos, que actúan como componentes estructurales de los cloroplastos. Consecuentemente un aumento en la síntesis de proteínas y formación de cloroplastos conduce a un incremento en el contenido de lípidos en las hojas, o bien un incremento en los constituyentes de los cloroplastos tales como clorofila y carotenos, la provitamina A (Schulze, 1957). Un incremento en el contenido de proteína de vegetales o granos de cereales esta comunemente relacionado con un efecto positivo con el aumento en el contenido de vitaminas B: riboflavina, tiamina y ácido nicotínico (Dressel y Jung, 1979), indicando que una alta proporción de estas proteínas representan enzimas en las cuales esta vitaminas B actúan como grupos prostéticos. Elevado contenido de nitrato en ciertas especies de plantas y organos indica un desbalance entre el suministro y la demanda de crecimiento(Fig. 8)(58, 59).

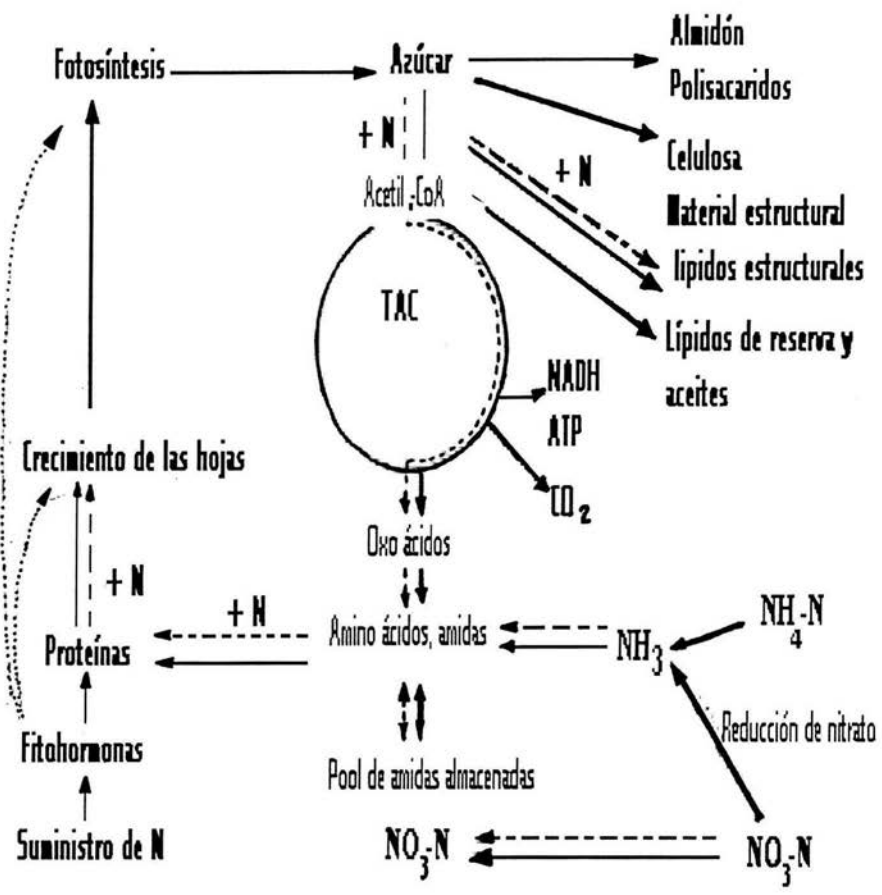


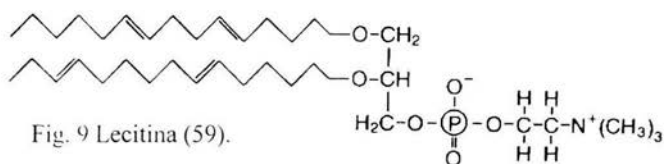
Fig 8. Modelo de el efecto de suministro de nitrógeno en el crecimiento de hojas en varios constituyentes de plantas. Clave: —> subóptimo a óptimo suministro de nitrógeno; - - - -> alto o excesivo suministro de nitrógeno(59).

3.2.2. FÓSFORO

A diferencia del nitrato y sulfato, el fósforo no es reducido en plantas pero permanece en su forma oxidada más alta. Después en los canales este permanece como fosfato inorgánico (Pi) o es esterificado a través de un grupo hidroxilo a un cadena de carbono como un simple ester de fosfato (C-O-P) o atado a otro fosfato por medio de un enlace rico en energía pirofosfato P-P (e.g., en ATP). La velocidad de intercambio entre el Pi y el P en el ester y el enlace pirofosfato son muy altas. Por ejemplo, el Pi es tomado por la raíz y es incorporado en pocos minutos en el órgano, pero después es liberado otra vez como Pi en el xylema (58.67).

La función del fósforo como un constituyente de estructuras macromoleculares es más prominente en ácidos nucleicos (Fig. 9), como unidad molecular del DNA, estos transportan la información genética y, como unidad de RNA, son estructuras responsables por la traducción de la información genética. En ambos DNA y RNA, el fósforo forma un enlace entre unidades ribonucleosidas para formar macromoléculas:

El fósforo es responsable por la fuerte naturaleza ácida de los ácidos nucleicos. La formación de enlaces diester fósforo es además abundante en los fosfolípidos de biomembranas. Este forma un puente entre un diglicérido y otra molécula (aminoácido, amina o alcohol). En la biomembranas la amina colina es comúnmente la pareja dominante, formando fosfatidilcolina (lecitina Fig. 9):



Las cargas eléctricas de la región hidrofílica juegan un importante papel en las interacciones entre la superficie biomembranal y los iones en su alrededor(48,58,59).

3.2.2.1.PAPEL EN LA TRANSFERENCIA DE ENERGÍA.

Aunque esta presente en bajas concentraciones en la célula, los ésteres de fosfato (C-P) y los fosfatos ricos en energía (P-P) representan la maquinaria metabólica de las células. Muchos ésteres de fosfato son intermediarios en rutas metabólicas de biosíntesis y degradación. Su función y formación son directamente relacionadas a la energía metabólica de las células y fosfatos de alta energía. La energía requerida, por ejemplo, para biosíntesis de almidón o para canales iónicos es suministrada por intermediarios ricos en energía o coenzimas, principalmente ATP(58,67).

La energía liberada durante la glucólisis, respiración o fotosíntesis es utilizada para la síntesis de enlaces pirofosfato y en la hidrólisis de estos enlaces aproximadamente 30kJ por mol de ATP es liberada. La energía de los enlaces pirofosfato de ATP pueden además ser transmitida a otras coenzimas las cuales difieren del ATP sólo en la base de nitrógeno, por ejemplo, uridín trifosfato (UTP) y guanosín trifosfato (GTP), los cuales son requeridos para la síntesis de azúcares y celulosa respectivamente(58).

La fosforilación de enzimas por ATP, GTP o ADP es otro mecanismo por el cual los fosfatos de alta energía pueden modular la actividad enzimática. Esta fosforilación regulatoria esta mediada por protein Kinasas y puede resultar en activación o inactivación y/o cambios en las propiedades alostericas de la molécula blanco (Budde Chollet, 1988) La desfosforilación es generalmente una reacción hidrolítica catalizada por ptein fosfatasas (Fig. 10)(59).

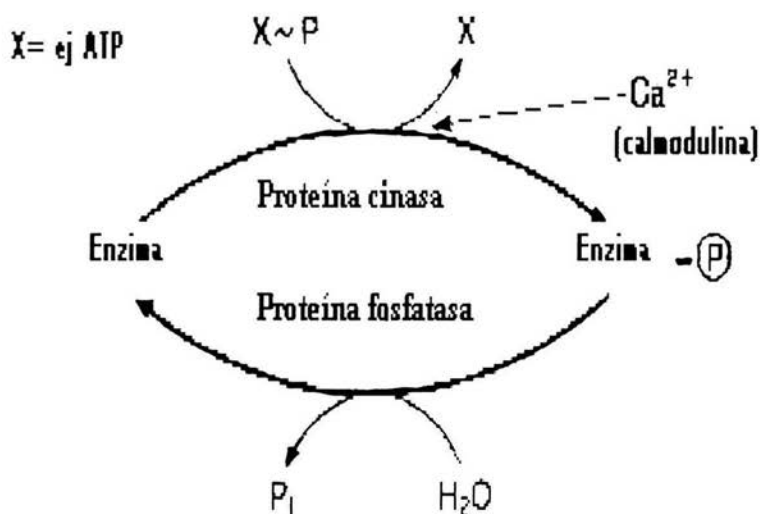


Fig 10. Modelo de la fosforilación y desfosforilación enzimática (59).

3.2.2.2. COMPORTAMIENTO Y PAPEL REGULATORIO DE FOSFATO INORGÁNICO.

En muchas reacciones enzimáticas, Pi es un sustrato o un producto final. La compartimentación es además esencial para la regulación de vías metabólicas en el citoplasma y los cloroplastos. En células vacuoladas de plantas superiores las vacuolas actúan como almacén concentrador, o concentrador no metabólico, de Pi, y el adecuado suministro de fósforo de la planta 85-95% del total de Pi, está localizado en las vacuolas (Bieleski and Ferguson, 1983). En contraste en hojas de plantas deficientes en fósforo virtualmente todo el fósforo se encuentra en el citoplasma y los cloroplastos (70).

En las hojas, la fotosíntesis y la división de carbono en el ciclo luz-oscuro son fuertemente afectados por la concentración de Pi en el estroma de los cloroplastos y la compartición entre cloroplastos y citosol. En la luz, para fotosíntesis óptima en cloroplastos una

concentración de Pi en el rango de 2.0-2.5mM son requeridas, y la fotosíntesis es totalmente inhibida cuando las concentraciones de Pi caen cerca de 1.4-1.0 mM (Robinson and Giersch, 1987; Heber et al., 1989). Debido a la larga demanda de pirofosfato para intermediarios fosforilados de fotosíntesis, en hojas de plantas deficientes de fósforo de concentración de Pi puede caer 50% siguiendo la transición luz-noche (30,34,70).

Un incremento en la concentración externa de Pi por arriba de 1mM estimula la fotosíntesis, pero disminuye drásticamente la incorporación de el carbono hacia almidón. La inhibición de la síntesis de almidón por las altas concentraciones de Pi es causada por dos separados mecanismos de regulación localizados en los cloroplastos. La llave enzimática de síntesis de almidón en cloroplastos, ADP-glucosa pirofosforilasa (camino 1 fig.11) es inhibido alostericamente por Pi y estimulado por Triosafosfato. El otro mecanismo de regulación por Pi es la liberación de triosafosfato (gliceraldehido-3-fosfato y fosfato de hidroxiacetona) el principal producto de fijación de CO₂. Esta liberación es controlada por un translocador fosfato, un acarreador específico localizado en el interior de al membrana sobre los cloroplastos (ruta dos, figura 11).

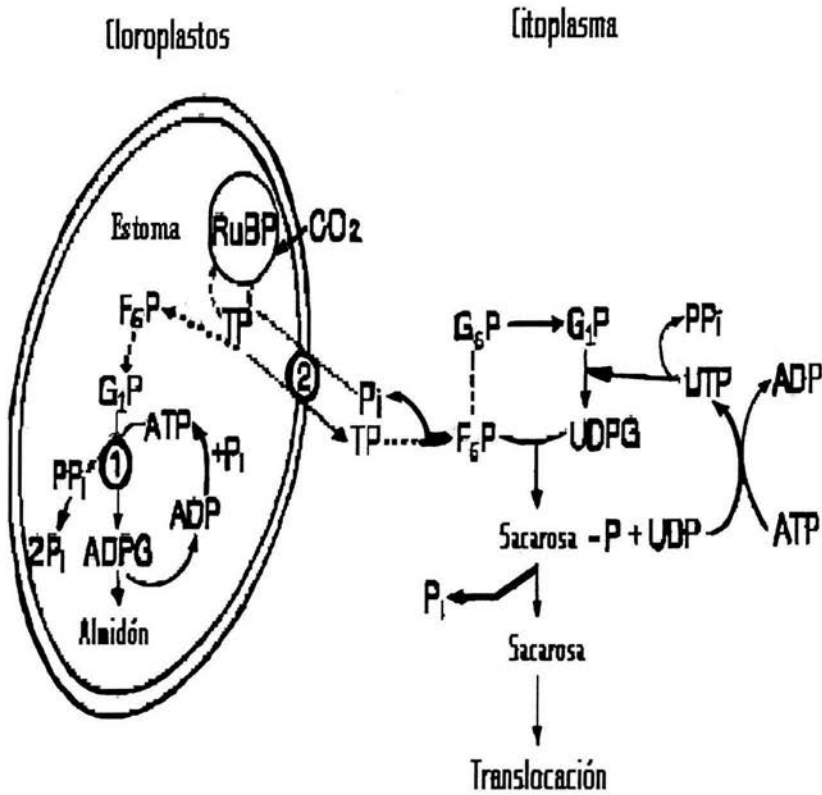


Fig. 11 Función reguladora del pirofosfato en la síntesis de almidón y la fotosíntesis (73)

La acumulación de almidón en cloroplastos de plantas deficientes de fósforo es de esperarse por dos razones, normalmente las bajas concentraciones de P_i en el citosol y de esta manera la baja, exportación de triosas de los cloroplastos, y el incremento en la actividad de ADPG-pirofosforilasa (Rao et al., 1990) debido a las bajas concentraciones de P_i en el estoma. El cambio a favor de la utilización de triosas para síntesis de almidón puede incluso reducir la actividad del ciclo de Calvin y la fijación de CO_2 por una limitada regeneración de RuBP (Fredeen et al., 1990). La acumulación de azúcares y almidón en las hojas de plantas deficientes de fósforo puede además ser indirectamente el resultado de la

baja exportación debido a limitaciones en ATP por el cotransportador sacarosa-protón (54,59).

Tipicamente bajo deficiencia de fósforo el crecimiento del retoño es mucho más deprimido que la fotosíntesis(33, 34).

3.2.2.3. ADMINISTRACIÓN DE FÓSFORO, CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN DE LA PLANTA.

El fósforo requerido para crecimiento óptimo esta en el rango de 0.3-0.5% de la materia seca durante la etapa vegetativa de crecimiento. La probabilidad de toxicidad por fósforo se incrementa cuando el contenido es más alto que 1% de materia seca. En plantas que experimentan la deficiencia de fósforo, la reducción en la expansión de la hoja y el área de superficie (Fredeen et al., 1989) además del número de hojas (Lynch et al., 1991), son los más notables efectos(59).

Comúnmente, el contenido de clorofila es incluso incrementado con bajo deficiencia de fósforo (Rao y Terry, 1989), y las hojas tienen un color verde oscuro la expansión de la hoja son más retardada que la formación de clorofila.

La disminución en la proporción de peso seco tallo-raíz en plantas deficientes de fósforo esta correlacionada con un incremento en la partición de carbohidratos hacia la raíz, indicado por un incremento particular en el contenido de sacarosa en la raíz de las plantas deficientes de fósforo (77).

3.2.3. POTASIO

El potasio es un catión univalente con un radio iónico hidratado de 0.331nm y una energía de hidratación de 314J mol⁻¹. Este canal es altamente selectivo y estrechamente acoplado a la actividad metabólica. Este se caracteriza por su alta movilidad en plantas a todos los niveles.

El K^+ es catión más abundante en el citoplasma. el potasio y sus acompañantes aniones hacen una mejor contribución a la potencial osmótico de las células y tejidos de especies de plantas glicofíticas. El potasio no es metabolizado y forma sólo complejos débiles en los cuales es prontamente intercambiable (Wyn Jones et al., 1979). Debido a su alta concentración en el citosol neutraliza los aniones macromolecularmente solubles (aniones orgánicos e inorgánicos) e insolubles y estabiliza el pH entre 7 y 8 en estos compartimentos (50,59).

3.2.3.1 COMPARTIMIENTO Y CONCENTRACIÓN CELULAR.

En casi todos los casos, la concentración de potasio citosolico es mantenida en el rango de 100-200nM (Leigh and Wyn-Jones, 1984). En estos compartimientos el K^+ no es reemplazable por otros cationes inorgánicos como el Na^+ . En contraste concentraciones de potasio vacuolar puede variar entre 10 y 200mM (Hsia y Lauchli, 1986) o puede incluso alcanzar concentraciones de 500mM en las células del estoma (59)

La función del K^+ en la célula y en otros procesos esta relacionada para la concentración de K^+ en la vacuolas. Para el rápido transporte de K^+ entre los diferentes compartimientos celulares, se requieren canales en las membranas. Los canales en las membranas se abren y cierran a diferente secuencia y longitud en respuesta a las señales ambientales y cambios en el electropotencial de las membranas y permite permeabilidad de iones tales como K^+ los cuales son 13 veces más rápido que la catálisis por bombas y acarreadores. Los iones potasio actúan directamente como solutos cambiando el potencial osmótico en los compartimientos y la presión de turgencia(66).

3.2.3.2 FUNCION METABÓLICA DEL POTASIO

El potasio es requerido para síntesis de proteínas en concentraciones más altas para la activación enzimática aproximadamente 50mM. El potasio esta involucrado en diversos pasos de la traducción, incluyendo la unión de RNAt a los ribosomas. El papel del K^+ en la

síntesis de proteínas no sólo se refleja en la acumulación de compuestos nitrogenados solubles (ej. amino ácidos, amidas y nitratos) en plantas deficientes de potasio, sino además puede ser demostrado directamente siguiendo la incorporación de nitrógeno inorgánico marcado N^{15} hacia la fracción de la proteína(59, 66).

Se ha observado que bajo deficiencia de potasio la expresión de un polipéptido de 45 kDa unido a la membrana se incrementa (47).

En plantas superiores el potasio afecta la fotosíntesis a varios niveles. El potasio es la respuesta dominante para el flujo de H^+ inducido por luz a través de la membrana tilacoide (Tester y Blatt, 1989) y para el establecimiento del gradiente de pH transmembranal necesario para la síntesis de ATP. El papel del potasio en la fijación de CO_2 puede ser demostrada más claramente con el aislamiento de los cloroplastos. Un incremento en la concentración de K^+ en el citosol de células intactas, estimula la fijación de CO_2 más de tres veces.

Para mantener el pHi en el estoma, en la fase luminosa, la entrada adicional de K^+ al citosol es requerido y mediado por un contraflujo H^+/K^+ a través de la envoltura del cloroplasto (Wu et al., 1991). Este contraflujo es dañino bajo estrés por sequía. El alto requerimiento de potasio en las hojas de las plantas expuestas a sequía o estrés salino (Chow et al., 1990) es la causa principal de mantener altas concentraciones de K^+ en el estoma bajo estas condiciones (59).

En ausencia de sequía o estrés salino, pero con un inadecuado suministro de potasio y por consecuencia un bajo contenido en las hojas, la velocidad de fotosíntesis es baja y esta principalmente relacionado a el contenido de potasio en las hojas(73).

3.2.3.3 SUMINISTRO DE POTASIO, CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS Y COMPOSICIÓN DE LAS PLANTAS

Seguido del nitrógeno, el potasio es el nutriente mineral requerido en cantidades más altas en plantas. El potasio requerido para óptimo crecimiento esta en el rango de 2-5% de el

peso seco de la planta. Cuando el K^+ es deficiente, el crecimiento se retarda, y la retranslocación neta de potasio se aumenta de hojas maduras y tallos, y bajo deficiencia severa estos órganos llegan a presentar clorosis y necrosis, dependiendo de la intensidad de la luz a la cual las hojas estén expuestas (32,33,59).

Cuando el suministro de agua en el suelo es limitado, la pérdida de la presión de turgencia y el marchitamiento son síntomas típicos de deficiencia de potasio(58).

Los cambios en la actividad enzimática y compuestos orgánicos que toman lugar durante la deficiencia de potasio, son en parte respuesta a la alta susceptibilidad de las plantas deficientes de potasio a un ataque por hongos(23).

3.2.3.4 MOVIMIENTO ESTOMAL

En muchas especies de plantas el potasio, esta asociado con un anion, un incremento en la concentración de potasio en las vacuolas incrementa su potencial osmótico y resulta en la toma de agua de las células adyacentes y un incremento en la presión de turgor de la vacuola y de esta manera la abertura del estoma. La acumulación de K^+ inducida por la luz en las vacuolas esta dirigida por una bomba ATPasa de protones en la membrana conocida por canal de K^+ en las células de la raíz(fig 12).

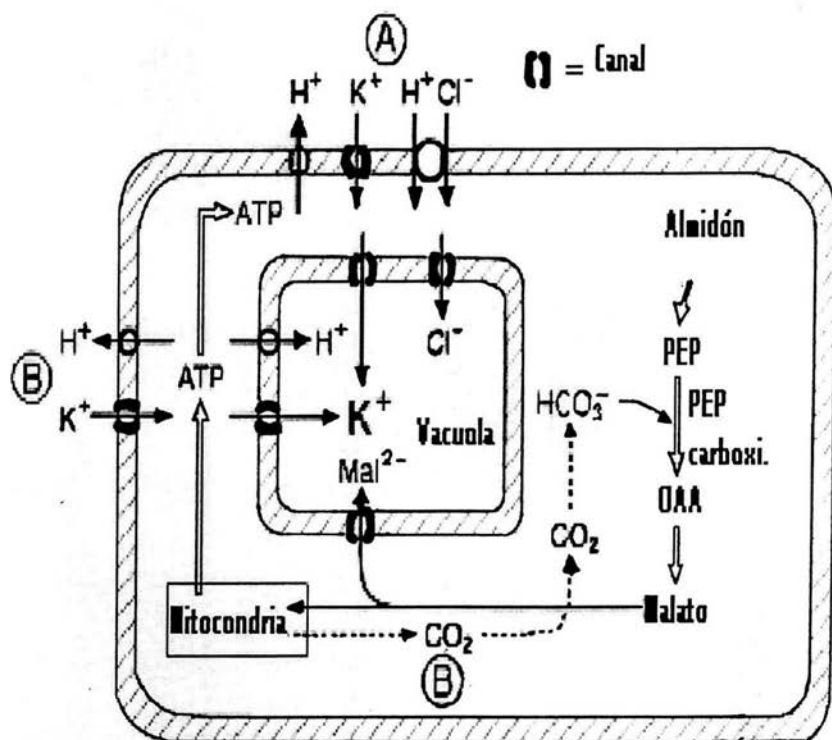


Fig. 12 Modelo de apertura de estoma dirigido por bombas de protones y transportadores de Cl/K (A) o transportadores $K + malato$ (B) hacia las vacuolas. (Modificado por Rascke et al. 1988).

La acumulación de K^+ en las vacuolas esta balanceado por un contra anion, principalmente Cl^- o malato²⁻, dependiendo la concentración de Cl^- en la vecindad de las vacuolas. El control del Cl^- hacia las vacuolas es mediado por un simport Cl^-/H^+ en la membrana plasmática (59, 66).

El cierre del estroma es inducido por oscuridad o ácido absísico (ABA) y esta asociado con una rápida salida de potasio acompañada de aniones en las vacuola. El ABA, induce el cierre del estroma derivado del xilema de las raíces (Davies y Meinzer, 1990), amplificada quizás por una concentración baja de Citosinas en la sabia del xilema (65).

3.2.4 AZUFRE

3.2.4.1 ASIMILACION Y REDUCCION DE SULFATO

En plantas superiores el primer paso para la asimilación de azufre es la activación de el ion sulfato por ATP. En esta reacción la enzima ATP sulfurilasa cataliza la remoción de dos grupos fosfato del ATP por el grupo sulfurilo, los cuales conducen a la formación de adenosin fosfosulfato (APS) y pirofosfato (Fig. 13). El adenosin fosfosulfato pueden servir como sustrato para la síntesis de ester de sulfato (ruta 1) o la reducción (ruta 2).

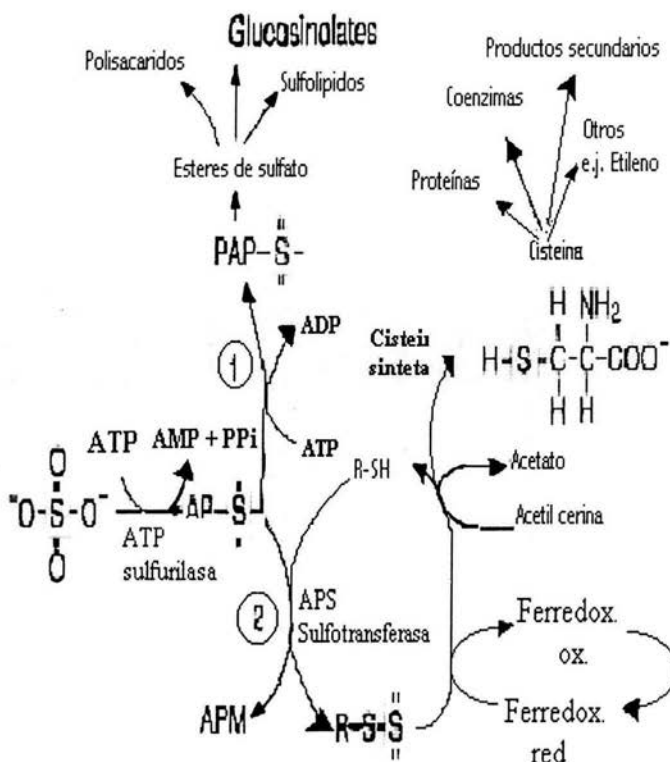


Fig. 13 Ruta de asimilación de azufre en plantas superiores y algas verdes. 1. Síntesis de ésteres de Sulfato, 2 Reducción de Sulfato (Basado en Schiff, 1983 y Schmidt y Lager, 1992)

La reducción de sulfato esta regulada a varios niveles (Stulen y De Kok, 1993) por:

1. Modulación de la actividad de ATP sulfurilasa
2. La disponibilidad de sulfato *in situ* a el sitio de la ATP sulfurilasa
3. Cambio en el nivel de APS sulfotransferasa
4. La disponibilidad de acetilserina para la cisteina sintetasa
5. Altas concentraciones de cisteina inhiben APS sulfotransferasa (49).

3.2.4.2 FUNCION METABÓLICA DEL AZUFRE

El azufre es un constituyente de los amino ácidos cisteina y metionina de las proteínas. Ambos amino ácidos son precursores de compuestos que contienen azufre como coenzimas y productos secundarios. El azufre es un constituyente estructural de estos compuestos o actúa como grupo funcional (ej. R-SH) directamente involucrado en reacciones metabólicas. Cerca del 2% del azufre orgánico reducido en las plantas esta presente en el agua como tioles (-SH), y bajo condiciones normales el tripéptido glutatión forma más del 90% de esta fracción (27,58).

En plantas superiores el contenido de glutatión es usualmente mas alto en hojas que en raíz, y en hojas más del 50% esta localizado en los cloroplastos (Rennenberg y Lamoureux, 1990). Además en las zonas apicales de la raíz , por ejemplo de maíz, el glutatión llega a ser el principal tiol componente de bajo peso molecular, el contenido esta en el rango de 0.7 mmol kg⁻¹ de peso fresco. cerca de cuatro veces mas que la cisteina (Nieto-Sotelo y Ho, 1986). El glutatión es soluble en agua y es un poderoso agente antioxidante en las plantas, y es probablemente más importante que el sistema redox cisteina-cisteina. Particularmente en los cloroplastos el antioxidante glutatión y ascorbato juegan un papel clave en la destoxicación de radicales de oxígeno y peróxido de hidrógeno. En las células, el glutatión es ampliamente mantenido en su forma reducida por la enzima glutatión reductasa. El papel como antioxidante del glutatión es reflejado, por ejemplo, en el incremento en la actividad de la glutatión reductasa. A intensidades altas de luz en plantas

deficientes de magnesio (Cakmak y Marschner, 1992) o en las respuesta a estrés oxidativo tales como ozono o dióxido de azufre (59).

El glutatión puede además funcionar como un almacén de azufre reducido (Schutz et al., 1991) y por consiguiente mantener una cierta concentración de cisteína celular (Schmidt y Jager, 1992). El glutatión es además el precursor de las fitoquelantinas los cuales funcionan en la detoxificación de ciertos metales pesados (58,59).

3.2.4.3 SUMINISTRO DE AZUFRE. CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN DE LA PLANTA.

Los requerimientos óptimos de azufre para el crecimiento varía entre 0.1 y 0.5% del peso seco en las plantas. El contenido de azufre de proteína además varía considerablemente entre la fracción de proteína de células individuales y la especie de planta.

Al igual que en la deficiencia de nitrógeno, en la deficiencia de azufre el crecimiento del retoño es más deprimido que el crecimiento de la raíz, conduciendo a una disminución de la proporción tallo / raíz (27,36). La inhibición de la síntesis de proteínas está correlacionada con una acumulación de nitrógeno orgánico soluble y nitrato. El contenido de sulfato es extremadamente bajo en plantas deficientes y se incrementa marcadamente cuando el suministro de sulfato es suficiente para un crecimiento óptimo, el mejor indicador llega a ser la proporción de sulfato en el contenido total de azufre (59).

Además no sólo el contenido de proteína disminuye sino también el contenido de azufre contenido en ellas, indicativo de que proteínas con baja proporción de metionina y cisteína son sintetizadas. Bajo deficiencia de azufre las proteínas zeínas en maíz, las cuales tienen un bajo contenido de azufre, se incrementa por cerca de 30% mientras que las proteínas ricas en azufre (Glutelina) disminuyen entre un 36 a 71% (59).

3.2.5 CALCIO

El calcio es el catión divalente relativamente más grande con un radio iónico hidratado de 0.412nm y una energía de hidratación de 1577 Jmol^{-1} . En el apoplasta, parte del calcio esta firmemente unido en estructuras, otra parte es intercambiable en la pared celular a la superficie externa de la membrana plasmática. Una alta proporción de calcio puede ser secuestrado in vacuolas mientras esta concentración en el citosol es extremadamente baja(50,59).

3.2.5.1 FORMA DE UNION Y COMPARTIMENTACION

En contraste a otros macronutrintes, un alta proporción del total del calcio en el tejido es comúnmente localizado en la pared celular. Esta distribución única es el resultado principal de la abundancia de los sitios de unión para el calcio en la pared celular o bien del transporte restringido de calcio hacia el citoplasma.

Una distribución típica de calcio en células con alta capacidad de intercambio cationico de la pared celular se muestra en la (figura 14).

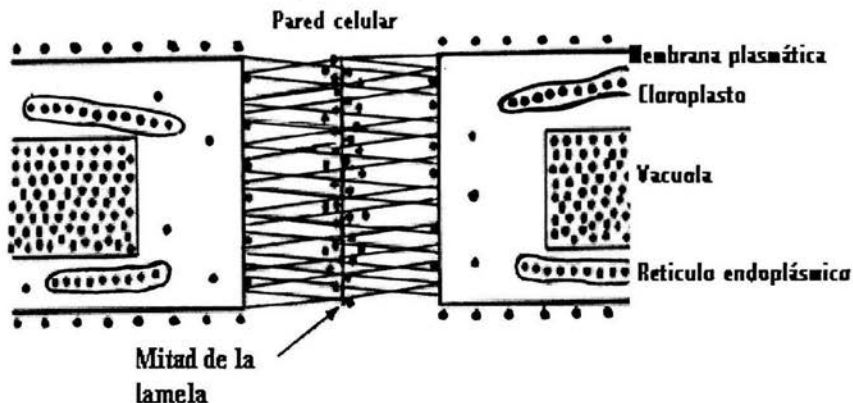


Fig 14 Representación esquemática de dos células adyacentes con una distribución típica de calcio (*).(57)

Estas son distintas áreas y compartimentos con altas o bajas concentraciones de calcio. Concentraciones altas de calcio se encuentran en la mitad de la lamela de la pared celular, en la superficie externa de la membrana plasmática, en el retículo endoplasmico y en las vacuolas. Mucho del calcio soluble en los tejidos de las plantas se encuentra localizado en las vacuolas, acompañado por aniones orgánicos (ej. malato) o iones inorgánicos (ej. nitrato, cloruro).

El mayor transportador de calcio libre en el citosol y presumiblemente en el retículo endoplasmico (Jones et al.,1993) es un bomba de calcio ATPasa ($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter; Kasai y Muto, 1990). El transportador de Ca^{2+} en el tonolasto es además logrado por un antiporter $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$, funcionando por la fuerza protón motriz de una bomba de protones ATPasa y PP_i asa (Fig 16). En promedio, estos antiporters mantienen una concentración de entre 10^5 entre el calcio libre en la vacuola y el citosol (59).

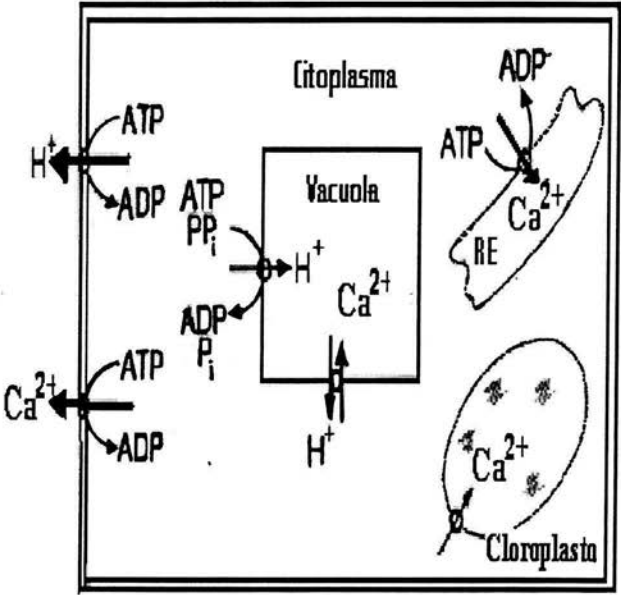


Fig. 15 Proceso de transporte de calcio en la membrana celular para mantener regulado el nivel de calcio libre (Modificado por Evans et al., 1991).

3.2.5.2 FUNCIÓN METABÓLICA, SUMINISTRO Y COMPOSICIÓN DE CALCIO EN LAS PLANTA.

En células vacuoladas de las hojas en particular, una gran proporción de calcio esta localizada en las vacuolas, donde puede contribuir al balance catión-anión debido a que actúa como un contenedor para aniones inorgánicos y orgánicos (59).

El papel del calcio como segundo mensajero esta basado en la muy baja concentración de calcio libre en el citosol, concentración en el rango de 0.1-0.2 μ M (Trewavas y Gilroy, 1991) y la alta concentración en varios compartimientos adyacentes (58).

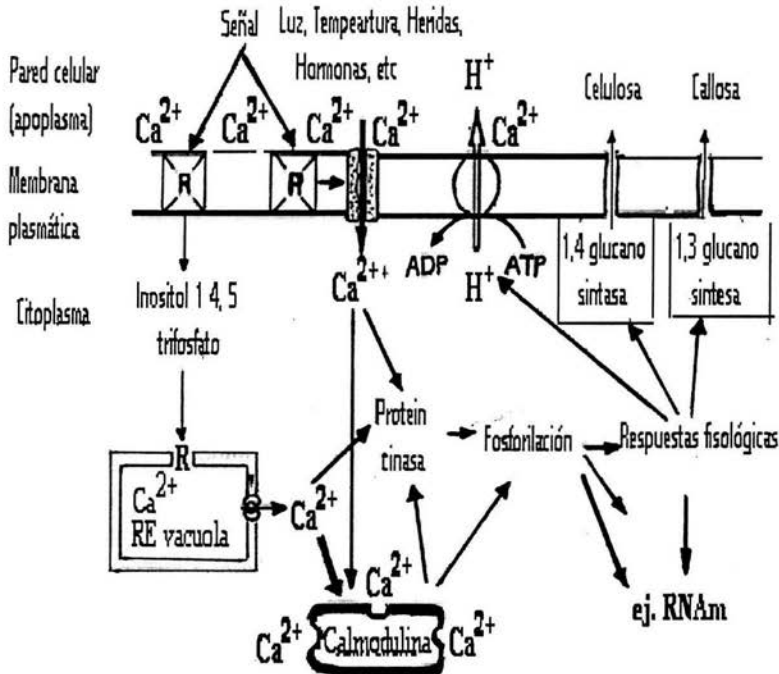


Fig. 16 Modelo del papel de calcio como segundo mensajero en la señal traduccional en plantas. R= Sitios receptores (58).

Las señales ambientales pueden activar los canales de calcio en la membrana de este pool de calcio y por consiguiente incrementar el flujo de calcio y las concentraciones de calcio libre en el citosol (Fig. 16). De tal forma un incremento en el Ca^{2+} libre citoplásmico es inducido, por ejemplo, por ABA (Tester 1990), IAA (Felle, 1988), luz (Roblin et al., 1989), infección patógena (Atkinson et al., 190), y estrés mecánico o daño (78).

En el citosol los principales blancos de las señales de calcio son proteína-calcio moduladoras, las más comunes son las calmodulinas (CaM) y calcio dependientes y proteína cinasas CaM-independientes (Roberts y Harmon, 1992). Las proteína cinasas dependientes de calcio son estimuladas directamente por calcio, estas enzimas se encuentran en la membrana plasmática. Las bombas de protones ATPasa en las cuales una enzima es fosforilada por acción de una cinasa dependiente de calcio (Roberts y Harmon, 1992). En otras instancia el calcio esta unido con alta selectividad pero reversible, a CaM, un polipéptido con cuatro sitios de unión para calcio(59).

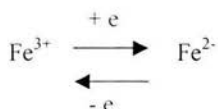
La función regulatoria del calcio citosolico libre además implica que la concentración de Ca^{2+} libre en el apoplasta de los tejidos en crecimiento ha sido regulado estrictamente, y el crecimiento de las raíces es sensible a los factores ambientales en los cuales disminuye la concentración de calcio en el apoplasta(58).

La concentración de calcio varia entre 0.1 y >5.0% de peso seco dependiendo las condiciones de crecimiento, la planta y el órgano de la planta

3.3 FUNCIONES DE LOS NUTRIENTES MINERALES: MICRONUTRIENTES

3.3.1. HIERRO

En sistemas aéreos manteniendo el pH fisiológico, las concentraciones de Fe^{3+} y Fe^{2+} son debajo de 10^{-15}M . Como regla, Fe(III) es tomado preferentemente en comparación con Fe(II) . El hierro como un elemento de transición es caracterizado por la relativa facilidad para cambiar de estado de oxidación



y por su habilidad para formar complejos octaédricos con varios ligandos.

3.3.1.1. HEMO PROTEÍNAS

La más conocida hemo proteína son los citocromos, los cuales contienen un complejo hemoporfirina-hierro como un grupo prostético. Los citocromos son constituyentes de los sistemas redox en cloroplastos en la mitocondria, y además como un componente en la cadena redox en la nitrato reductasa. Esta leghemoglobina puede actuar como una señal molecular indicando deficiencia de O_2 e iniciando un cambio metabólico hacia la fermentación.

3.3.1.2. PROTEINAS HIERRO-AZUFRE.

En estas proteínas nohemo el hierro esta coordinado con el grupo tiol de la cisteina (Fig. 18) o con el azufre como racimos. Una de los más bien conocidos es la ferredoxina, la cual actúa como un transportador de electrones en un número de procesos metabólicos básicos.

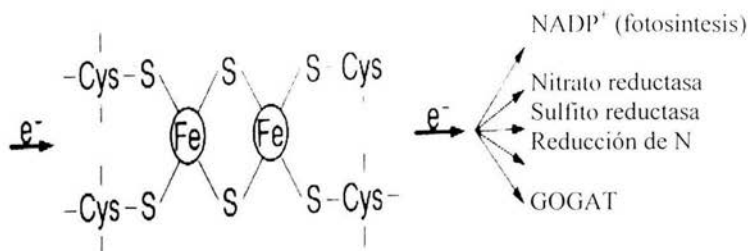


Fig. 17 Modelo de unión Hierro-Grupo tiol en proteínas (58).

Otro ejemplo de proteínas hierro-sulfuradas son las isoenzimas de la superóxido dismutasa (SOD) la cual contiene hierro como un componente metálico de el grupo prostético (FeSOD).

En raíces deficientes de hierro, la actividad de la peroxidasa esta muy abatida (58).

3.3.1.3. LOCALIZACIÓN DEL HIERRO.

Cuando las plantas crecen bajo condiciones controladas, cerca del 80% del hierro esta localizado en los cloroplastos en hojas que crecen rápidamente. Además puede ser almacenado en el estroma de plastidos como fitoferritina. Esta consiste de un esqueleto de proteína y en su interior existen 5000 atomos de hierro como Fe (III) almacenado (65).

Durante la germinación la fitoferritina es rápidamente degradada, probablemente catalizada por la liberación de Fe^{2+} y la generación de radicales los cuales destruyen el esqueleto de la proteína (48,59).

3.3.2 MANGANESO

Puede existir en los estados de oxidación 0, II, III, IV, VI y VII. En sistemas biológicos, los principales estados de oxidación son II, III, IV con Mn (II) y Mn (IV) llegan a ser estables y Mn (III) es inestable (Hughes y Williams, 1988). En plantas el Mn (II) es por mucho la forma dominante pero puede ser prontamente oxidado a Mn (III) y Mn (IV).

3.3.2.1 ENZIMAS QUE CONTIENEN MANGANESO

Las enzimas mejor conocidas que son activadas con manganeso son la manganeso-proteína en el fotosistema II (PS II) y la manganeso superoxido dismutasa (MnSOD).

La enzima más conocida es la que se encuentra asociada con el fotosistema II. En este sistema de cuatro átomos de manganeso ordenados en racimo actúan como un dispositivo para acumular cargas positivas previo a la oxidación de cuatro electrones de dos moléculas de agua:

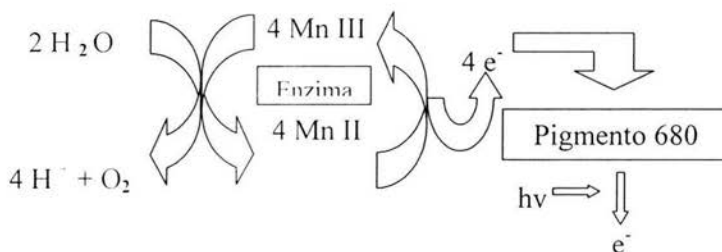


Fig. 18. Función del magnesio en la fotosíntesis.

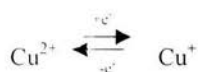
3.3.2.2 DEFICIENCIA DE MANGANESO Y TOXICIDAD

La síntesis de proteínas no se afecta en tejidos deficientes de manganeso. La deficiencia de manganeso es abundante en plantas que crecen en suelos derivados de material inerte bajo en manganeso y en suelos altamente lixivados. Esto además es común en suelos de pH alto que contienen carbohidratos libres, particularmente cuando están combinados con grandes cantidades de materia orgánica (48,59).

En muchas especies de plantas la toxicidad por manganeso esta caracterizada por manchas café en hojas maduras. Aunque estas manchas café contienen manganeso oxidado, el color café no deriva del manganeso (MnO_2) pero si de polifenoles oxidados (Wissemeier y Horst, 1992). La formación de manchas café es precedida por aumento de callosidad en la misma área, indicando el efecto toxico del Mn^{2+} en la membrana plasmática y aumento en la entrada de Ca^{2+} ((Wissemeier y Horst, 1987) como una señal para la formación de callo. En muchas instancias los síntomas de toxicidad ocurren como clorosis intervenal y necrosis (Nable et al., 1988), los síntomas son combinados con deformaciones de las hojas jóvenes, lo cual es un síntoma típico de deficiencia de calcio(48,59).

3.3.3 COBRE

El cobre es un elemento de transición y presenta similitudes con el hierro, tales como la formación de complejos altamente estables y transferencia fácil de electrones:



El cobre divalente es prontamente reducido a cobre monovalente, el cual es inestable. Muchas de las funciones del cobre en la nutrición de las plantas esta basada en la participación de enlaces enzimaticos en reacciones redox. Tiene una gran afinidad por peptidos y grupos sulfidrilos, en particular proteínas ricas en cisteina o bien por grupos fenólicos y carboxílicos.

3.3.3.1 PROTEÍNAS CON COBRE

De acuerdo con Sandmann y Boger, existen tres diferentes tipos de proteínas en las cuales el cobre es el componente metálico (Cu-proteína): a) proteínas azules (ej plastocianina), con función de transferencia de un electrón, b) proteínas no azules, las cuales representan a las peroxidasas y mono o difenol oxidasas, y c) proteínas multicobre conteniendo al menos cuatro átomos de cobre, las cuales actúan como oxidasas (58).

Bajo deficiencia de cobre la actividad de estas enzimas disminuye bastante, pero no toda(49).

3.3.3.2 DEFICIENCIA DE COBRE

La deficiencia de cobre se observa en plantas que crecen en suelos inertes bajos en cobre y en suelos con alto contenido de materia orgánica donde el cobre es acomplejado con sustancia orgánicas (59).

Los niveles para deficiencia crítica de cobre en plantas vegetativas esta generalmente en el rango de $1-5\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, dependiendo la especie de planta, el órgano, la etapa de desarrollo y el suministro de nitrógeno (48).

Hojas jóvenes marchitas, es característico de plantas deficientes en cobre esto es el resultado del deterioro del transporte de agua debido al insuficiente lignificación de vasos del xilema o de la debilidad estructural de la pared celular. La inhibición en el transporte de calcio hacia áreas de nuevo crecimiento puede ocurrir en plantas deficientes de cobre (Brown, 1979), pero un síntoma secundario es relacionado con la alteración del metabolismo de fenol ($\text{Ca}^{2+}/\text{IAA}$)(75).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Conocer el perfil de proteínas de *Zea mays* sometidas a distintos tipos de estrés nutrimental por medio de SDS-PAGE.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Montar las técnicas y condiciones adecuadas para la extracción, cuantificación y corrimiento electroforetico de proteínas en plantas de *Zea mays*.
- Extraer el contenido de proteína total de plantas de *Zea mays* por homogenización con mortero imponiendo las condiciones químicas y físicas óptimas para evitar la hidrólisis proteica.
- Cuantificar el contenido proteico por el método de Biuret de plantas de *Zea mays* sometido a estrés nutrimental.
- Conocer por electroforesis en geles de poliacrilamida el perfil de proteínas obtenidas de plantas de *Zea mays* sometida a estrés nutrimental.

5. HIPÓTESIS

Con el conocimiento previo de que en sistemas biológicos auxotrofos la carencia de algún nutriente provoca la regulación génica del organismo que le permitan enfrentarse a esta deficiencia, la hipótesis que se plantea para el presente trabajo es: al variar la concentración de nutrientes (N, P, K, materia orgánica), tipo y pH del suelo en *Zea mays* durante su ciclo biológico, entonces el mecanismo de regulación génica ocasionara la modificación del perfil proteico de la planta, debido a la activación de algunos genes y la represión de otros con la subsiguiente aparición de algunas proteínas ó desaparición y/o disminución en su concentración de otras.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

El montaje del experimento se realizó utilizando Charolas de plástico de 0.5mts³, con los pH's en la tabla No. 4 reportados y utilizando los siguientes sustratos:

Tabla 4. Montaje del experimento.

Suelos	pH	TRATAMIENTO			
		Composta	Nitrógeno	Potasio	Fósforo
Vertisol abonado	7.55	50% p/p	-----	-----	-----
Composta	8.10	100% de materia orgánica	-----	-----	-----
Arena testigo	7.29	-----	-----	-----	-----
Arena abonado	7.66	-----	-----	-----	-----
Arena N, P	5.70	-----	Urea 5.56g por planta.	KCl 1.25g por planta.	-----
Arena N, K	5.64	-----	Urea 5.56g por planta.	KCl 1.25g por planta.	-----
Arena K, P	6.35	-----	-----	KCl 1.25g por planta.	Super fosfato triple 0.5869g por planta.
Salino alcalino testigo	7.89	-----	-----	-----	-----
Salino alcalino abonado	7.80	50% p/p	-----	-----	-----
Rojo testigo	7.00	-----	-----	-----	-----
Rojo abonado	7.36	50% p/p	-----	-----	-----
Rojo nitrogenado	7.45	-----	Urea 5.56g por planta.	-----	-----

Los sustratos fueron preparados en el laboratorio del Dr. Arturo Aguirre en FES-Campo 4

Se utilizó un tamiz comercial para homogenizar los suelos, se sembraron 5 semillas por charola y se regaron los suelos dos veces por semana utilizando 500 ml (promedio) por charola. Sin tratamiento agroquímico distribuidas uniformemente.

Fecha de siembra de todos los suelos: 14 de Febrero de 2003

6.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a su amplia utilización los países en desarrollo dedican más tierra de cultivo de maíz que los países desarrollados. Sin embargo el rendimiento por hectárea de los Estados Unidos ha aumentado considerablemente desde 1961, en tanto en México, Guatemala y Nigeria, países en los que la ingesta de maíz de los habitantes es elevada especialmente en los primeros dos sólo se ha incrementado ligeramente desde esta fecha. Mientras que la mayor parte de la producción de los países en desarrollo se dedica al consumo humano, la del mundo desarrollado sirve fundamentalmente para la elaboración industrial y para pienso (FAO).

Un factor que impacta negativamente a la producción agrícola alrededor del mundo es "el estrés salino" (3).

El programa de naciones Unidas estima que aproximadamente el 20% de la agricultura y por otro lado el 50% de las cosechas en el mundo están estresadas por sales (70).

La optimización de la fertilización juega un papel importante para conseguir cosechas altas, sin embargo esto resulta ser un proceso complejo ya que es regulado por la interacción del genotipo de la planta, el suelo, las condiciones climáticas y la tecnología (38)

6.3. METODOLOGÍA

6.3.1 TOMA DE MUESTRA

Fueron recolectadas plantas completas lavando el exceso de sustrato con agua destilada y sometidas a homogenización inmediata para su posterior cuantificación y corrida electroforética.

6.3.2 HOMOGENIZACION

FUNDAMENTO: La homogenización se basa en el rompimiento de membranas celulares por métodos físicos, químicos o mecánicos.

Para purificar o caracterizar una proteína intracelular, se debe realizar un método eficiente de ruptura celular el cual libere a la proteína en su forma soluble del compartimiento intracelular hacia el medio. Debido a que este es el paso inicial para todos los subsecuentes procedimientos, el método de ruptura no debe ser dañino para la proteína de interés.

El rompimiento de células para aislamiento de proteínas puede dar como resultado la liberación de proteasas de los compartimentos subcelulares. Estas proteasas comúnmente deben ser removidas o inhibidas rápidamente para asegurar que las proteínas de interés permanezcan intactas.

PROCEDIMIENTO.

La homogenización se llevó a cabo en una cámara de frío a una temperatura de 4⁰C, homogenizando por un tiempo de 30 a 60min aproximadamente, el material y reactivos utilizados se llevaron a la misma temperatura del cuarto.

Se utilizó por cada gramo de muestra 1 volumen de buffer de extracción utilizándose los siguientes reactivos:

3 ml de PVP 1.5%
 8.85 ml de Buffer Tris pH 7.0 0.2M
 0.15 ml de Benzamida 1 mM
 3 ml de EDTA 10 mM
 para un volumen total de 15.0 ml

6.3.3 CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL MÉTODO DE BIURET.

FUNDAMENTO: las estructuras peptídicas que contengan como mínimo dos enlaces peptídicos forman un complejo colorido con los iones cobre, cuantificándose mediante una curva patrón por espectrofotometría (83)

PROCEDIMIENTO

La curva de calibración para cuantificación de proteínas se realizó como se indica en el Tabla No. 5:

Tabla No. 5. CURVA DE CALIBRACION

NUMERO DE MUESTRA	mg DE PROTEINA	SOLUCION ESTANDAR 5mg/ml	SOLUCION SALINA 0.9%	RACTIVO DE BIURET
1	0	0 ml	3.5 ml	1.5 ml
2	0.1	0.1 ml	3.4 ml	1.5 ml
3	0.3	0.3 ml	3.2 ml	1.5 ml
4	0.5	0.5 ml	3.0 ml	1.5 ml
5	1.0	1.0 ml	2.5 ml	1.5 ml
6	1.5	1.5 ml	2.0 ml	1.5 ml

Para la cuantificación de proteína en las muestras se utilizaron 1.5 ml de reactivo de Biuret, 3.4 ml de Solución salina y 100µl de muestra para cada sistema.

Leyéndose todo los sistemas en un Klett utilizando filtro verde, después de transcurridos 15 min.

6.3.4 ELECTROFORESIS

FUNDAMENTO: Es un método de separación, cuantificación e identificación, basado en la migración de partículas. Influenciadas por el tamaño y peso molecular, así como el tamaño de poro utilizado para tal fin.

La velocidad de migración de una proteína en un campo eléctrico depende de la fuerza del campo (E), de la carga neta de la proteína (z) y del coeficiente de fricción (f)

$$V = \frac{E z}{F}$$

El coeficiente de fricción depende tanto de la masa y de la forma de molécula que migra como de la viscosidad (n) del medio.

GELES. Poliacrilamida: son formados por copolimerización de monómero de acrilamida, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ y un copolímero N'-N-metilen bisacrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$.

El mecanismo de formación del gel es una polimerización catalizada por la generación de un radical libre en el sistema compuesto por persulfato de amonio (el iniciador) y un

acelerador el TEMED. El TEMED causa la formación del radical libre del persulfato y este es el catalizador de la polimerización (Fig. 21). El oxígeno interfiere con la polimerización.

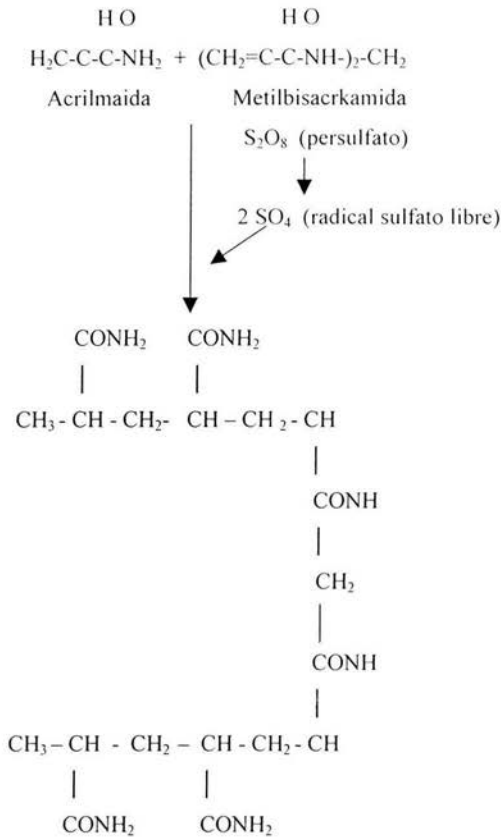


Fig. 19 Mecanismo de formación de la red de poliacrilamida

Las proteínas pueden separarse muy bien, según sus masas moleculares, utilizando electroforesis sobre gel de poliacrilamida, en condiciones desnaturizantes. La mezcla de proteínas se disuelve primero en un medio con dodecil sulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico capaz de romper casi todas las interacciones no covalentes en las proteínas nativas. También se añade mercaptoetanol para reducir los puentes disulfuros. Los aniones de SDS se unen a la cadena principal a razón de un SDS por cada dos aminoácidos, lo que da al complejo SDS-proteína desnaturizada una carga negativa aproximadamente proporcional a la masa de la proteína. Al ser la carga negativa, adquirida por fijación de SDS, muy superior a la carga propia de la proteína nativa, esta carga se

considera despreciable. Los complejos SDS-proteína se someten entonces a electroforesis sobre gel de poliacrilamida, que normalmente se utiliza como un bloque delgado dispuesto verticalmente. La dirección de la electroforesis es vertical descendente. Por último, las proteínas pueden visualizarse sobre gel tiñéndolas con plata o con un colorante como el azul de Coomassie, que revela una serie de bandas. Cuando se tiñe con azul de Coomassie, basta 0.1 μg de proteína (≈ 2 pmoles) para dar una banda diferenciada, mientras que una tinción de plata se necesita menor cantidad ($\approx 0.02\mu\text{g}$).

PROCEDIMIENTO:

La electroforesis se realizo en geles de poliacrilamida al 10%, utilizando los siguientes reactivos:

Tabla No. 6 Preparación de los geles de acrilamida

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (ml)
Agua	-----	4.85
Tris-HCl	2.0 M	2.5
Acrilamida	30 %	2.5
SDS	10 %	0.1
Persulfato de amonio	10 %	0.1
TEMED	Conc.	0.05

Las muestras se prepararon colocando un concentración mínima de 50 μg / ml por pozo y la corrida se llevo a 150 volts por un tiempo de 75 min.

Terminado en tiempo los geles fueron teñidos con azul de Coomassie por un lapso de 5 hrs., para su posterior desteñimineto con solución de ácido acético glacial metanol.

6.4 REACTIVOS Y MATERIAL

MATERIAL

1 Klett
2 celdas de cuarzo
1 Equipo de electroforesis
Micropipetas
Puntillas
1 Matraz volumétrico de 10ml
1 Matraz volumétrico de 50 ml
1 Matraz volumétrico de 100 ml
1 Matraz volumétrico de 500 ml
pipeta graduada de 5 ml
pipeta graduada de 10 ml
Viales
Mortero y pistilo
Agitador magnético
Parrilla eléctrica con agitador
Embudo de vidrio
1 pH metro
Gasas
Centrifuga
Tubos de ensaye
Papel filtro Whatman No. 1 y 4
Fuente de poder

REACTIVOS

Carbón activado
Dodecil sulfato de sodio (SDS)
Azul de coomassie
TEMED
Persulfato de amonio
TRIS-HCl
Acrilamida
Bis acrilamida
Agua destilada
Glicina
Glicerol
HCl conc.
2-mercaptoetanol
Polivinil pirrolidona
Benzamida
EDTA
Albúmina
NaOH
Reactivo de Biuret
Etanol
ácido fosfórico
Buffer de referencia pH 4.0, 7.0, 9.0
Estándar de pesos molecular Marca Gibco BRL
BenchMark

7. RESULTADOS

La concentración de iones en los sustratos se cuantificó con kit de la compañía Bio-Rad, el cual proporcionaba los siguientes resultados:

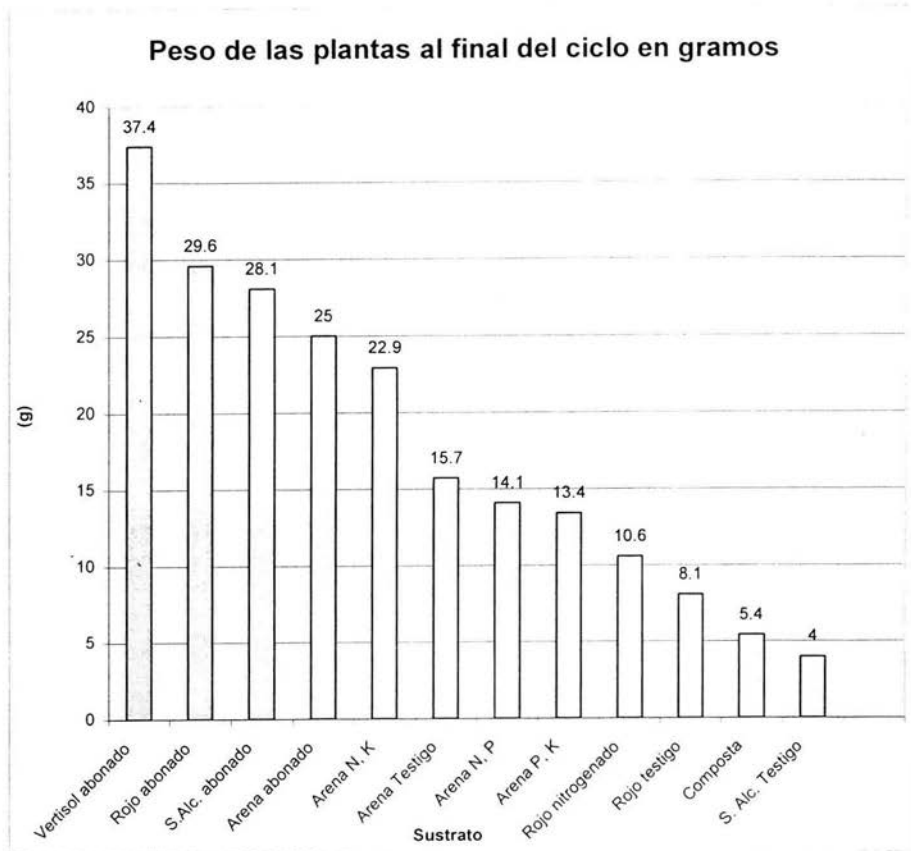
Nitrógeno: Bajo 0–35 ppm · **Fósforo** Medio: 0-50 ppm **Potasio** Bajo: 0-10 ppm
 Medio: 35-50 ppm Alto: 50–100 ppm Medio 10-250 ppm
 Alto: 50 – 500 ppm Alto: 250-500 ppm

Teniendo como resultado que los suelos con composta y a los que se les administro algún ión se encontraban en el rango medio que son los valores normales de concentración necesaria para el desarrollo normal de la planta y los suelos testigos reportaban valores en el rango de bajo en alguno de los iones.

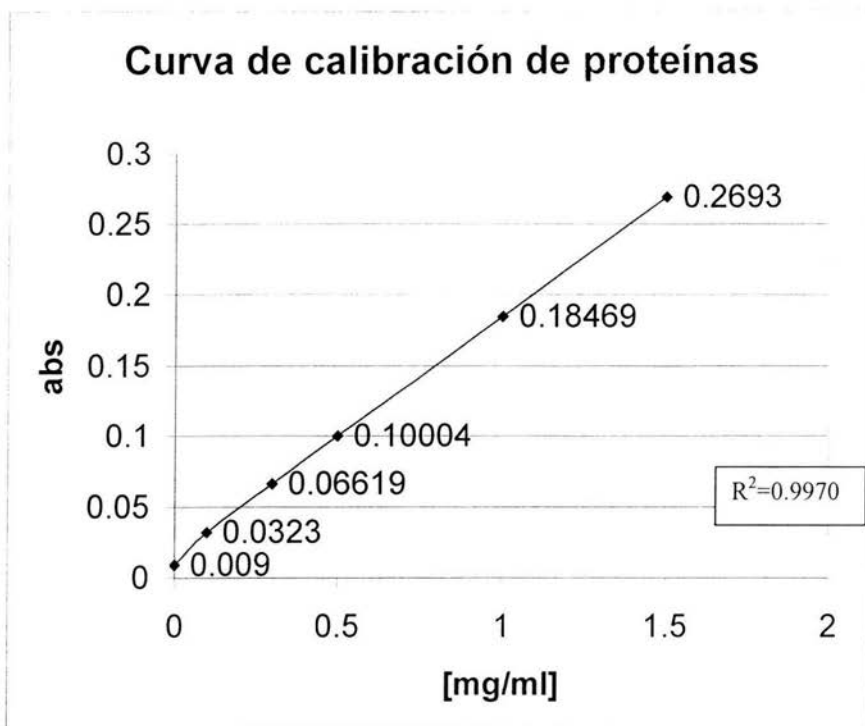
Para el caso del peso los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla No. 7 Peso total de las plantas por sustrato separado en tallo y raíz

SUBSTRATO		Testigo	Abonado	Nitrogenado	P, K	N, K	N, P
Luvisol (suelos rojos)	Peso tallo	6.1 g	21.0 g	10.6 g	-----	-----	-----
	Peso raíz	2.0 g	8.6 g	4.1 g	-----	-----	-----
	Peso total	8.1 g	29.6 g	10.6 g	-----	-----	-----
Vertisol	Peso tallo	-----	25.2 g	-----	-----	-----	-----
	Peso raíz	-----	12.2 g	-----	-----	-----	-----
	Peso total	-----	34.7 g	-----	-----	-----	-----
Solonetz (suelos salinos)	Peso tallo	3.0 g	20.5 g	-----	-----	-----	-----
	Peso raíz	1.0 g	7.6 g	-----	-----	-----	-----
	Peso total	4.0 g	28.1 g	-----	-----	-----	-----
Arena de río	Peso tallo	9.9 g	16.0 g	-----	13.4 g	22.9 g	14.1 g
	Peso raíz	5.8 g	9.0 g	-----	7.9 g	18.0 g	9.2 g
	Peso total	15.7 g	25.0 g	-----	5.5 g	4.9 g	4.9 g
Composta	Peso tallo	2.3 g	-----	-----	-----	-----	-----
	Peso raíz	3.1 g	-----	-----	-----	-----	-----
	Peso total	5.4 g	-----	-----	-----	-----	-----



Gráfica No.1 Peso Total de plantas



Grafica No. 2 Curva de calibración de proteínas

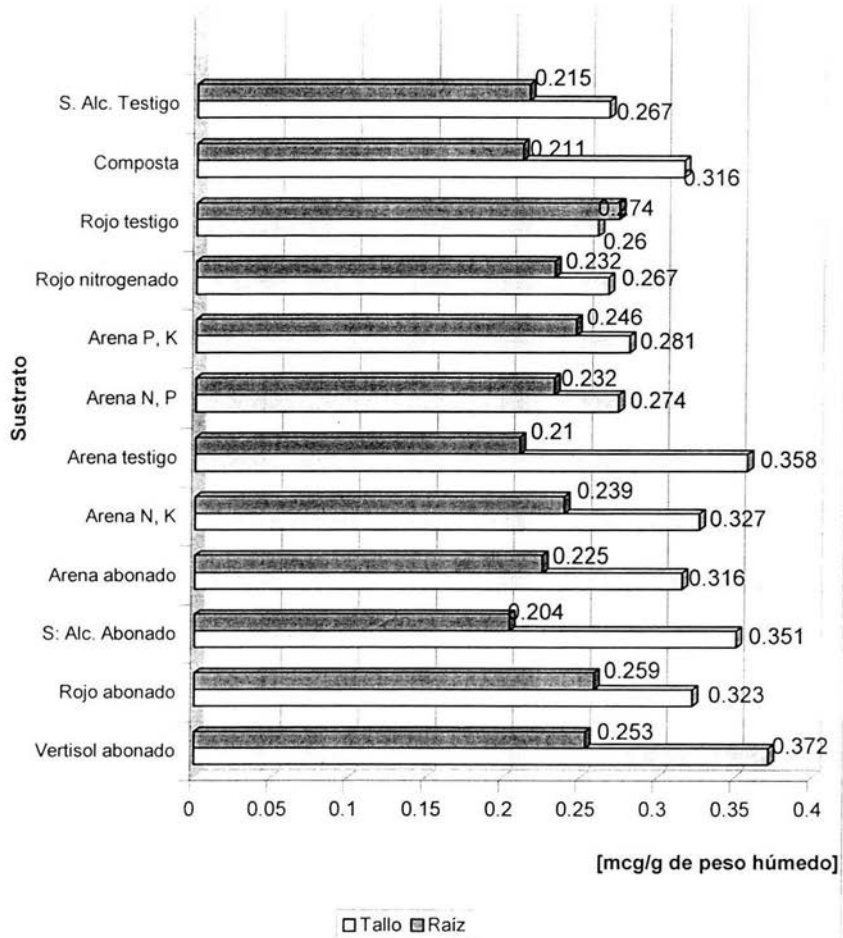
Tabla No. 8 Resultado de la curva de calibración de proteínas

Sistemas	[mg/ml]	abs
1	0	0
2	0.1	0.0323
3	0.3	0.06619
4	.5	0.10004
5	1.0	0.18469
6	1.5	0.2693

Tabla No. 9 Cuantificación de Proteínas en gramos de peso húmedo

SUSTRATO	TALLO [$\mu\text{g/ml}$]	RAIZ [$\mu\text{g/ml}$]
Vertisol abonado	0.372	0.253
Rojo abonado	0.323	0.259
Salino alcalino abonado	0.327	0.239
Arena abonado	0.267	0.215
Arena N, K	0.358	0.210
Arena testigo	0.351	0.204
Arena N, P	0.358	0.372
Arena P, K	0.316	0.225
Rojo nitrogenado	0.267	0.232
Rojo testigo	0.260	0.274
Composta	0.316	0.211
Salino alcalino testigo	0.274	0.232

Cuantificación de proteínas



Grafica No. 3 Cuantificación de proteínas totales.

Tabla No. 10 Tamaño de las plantas y número de hojas.

Sustrato	Vertisol abonado	Rojo abonado	Salino alcalino abonado	Arena abonado	Arena N, K	Arena Testigo	Arena N, P	Arena P, K	Rojo nitrogenado	Rojo testigo	Composta	Salino alcalino testigo
Tamaño del Tallo	40 cm	32.5 cm	12.0 cm	25 cm	42cm	24.5cm	47.5cm	55.5cm	11.0 cm	52.0 m	18.0 cm	11.0cm
	44 cm	48.0 cm	10.0 cm	21 cm	30cm	18.5cm	51.0cm	43.5cm	11.5 cm	41.0cm	19.0 cm	12.0cm
Tamaño de la raíz	44.0 cm	28.0 cm	10.0 cm	20.0 cm	20.0cm	42.0cm	13.0cm	20.0cm	35.0 cm	45.0cm	15.0 cm	10.0cm
	46.0cm	30.0 cm	9.0 cm	15.0 cm	17.0cm	38.0cm	25.0cm	18.0cm	32.5 cm	39.0cm	20.0 cm	10.5cm
					15.5cm	35.5cm	14.0cm	19.5cm		30.0cm		8.5 cm
					17.0cm	40.0cm				25.0cm		

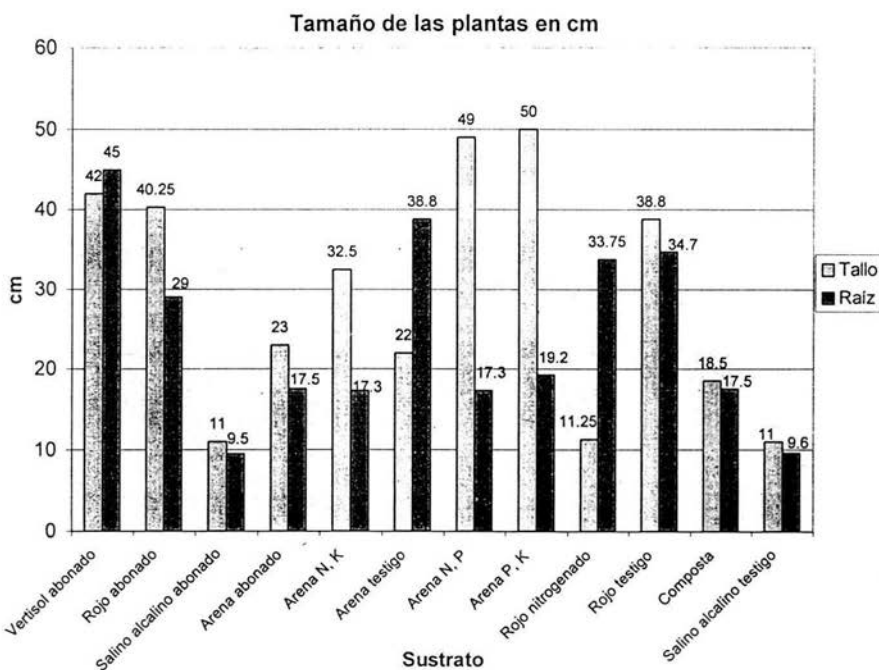
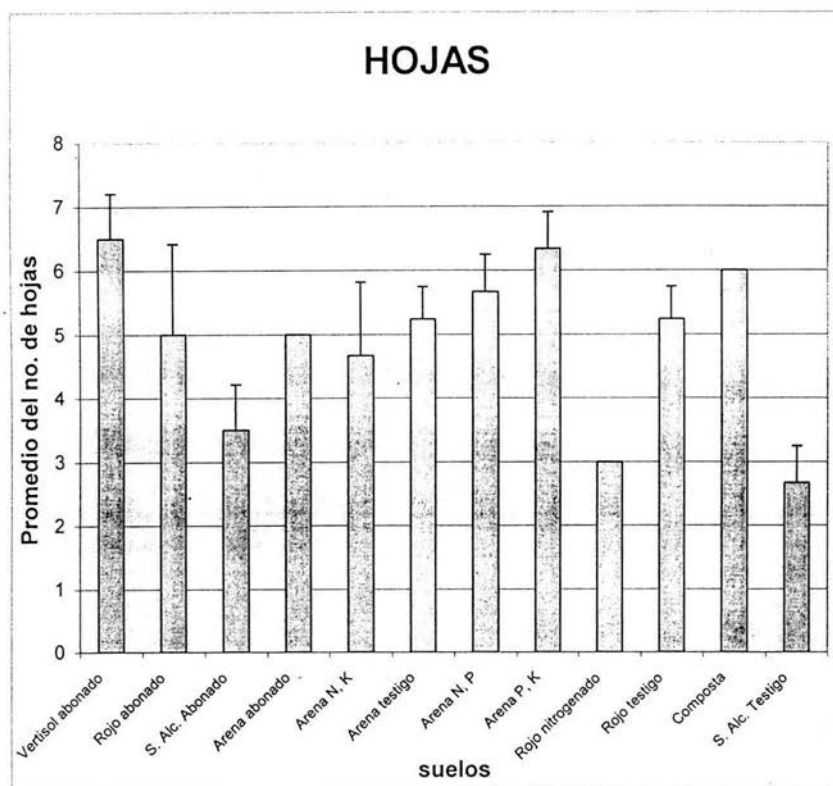


Grafico No. 4 Tamaño de las plantas

Tabla No. 11 Promedio del número de hojas por planta

	Vertisol abonado	Rojo abonado	Salino alcalino abonado	Arena abonado	Arena N, K	Arena testigo	Arena N, P	Arena P, K	Rojo nitrogenado	Rojo testigo	Composta	Salino alcalino testigo
Promedio del # de hojas	6.5	5.0	3.5	5.0	4.5	5.2	5.6	6.6	3.0	5.2	6.0	2.6



Grafica No. 5 Promedio de hojas en cada sustrato

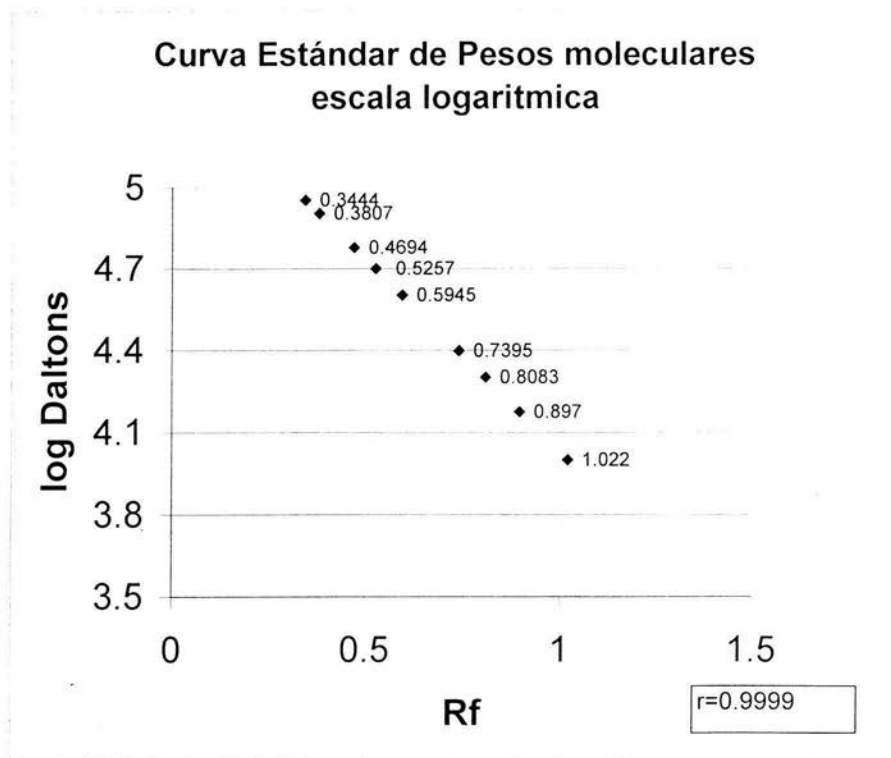


Grafico No. 6 Curva Estándar de Marcadores moleculares (Gibco BRL BenchMark).

Tabla No. 12 Pesos Moleculares del estándar de proteínas.

Peso Molecular kDa	log del Rf
10	1.022
15	0.8970
20	0.8083
30	0.7095
40	0.5945
50	0.5257
60	0.4694
80	0.3807
100	0.3444

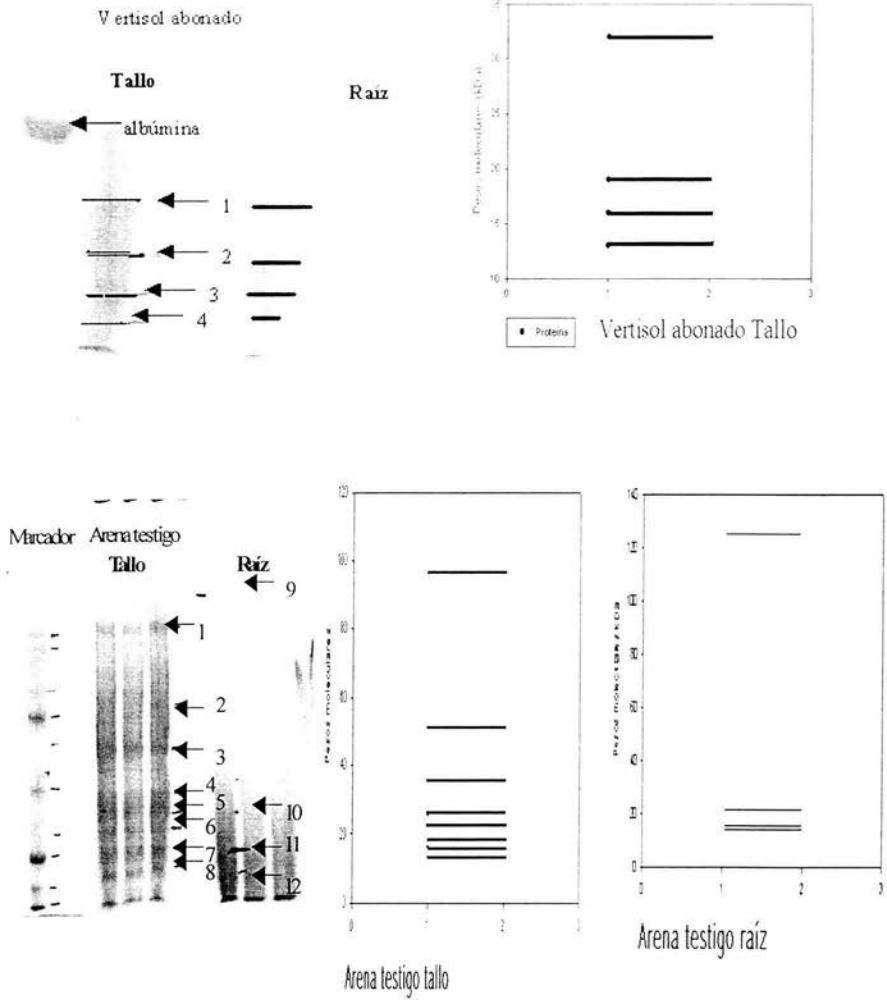
Tabla No. 13 Pesos Moleculares obtenidos con cada sustrato (Separado en Raíz – Tallo)

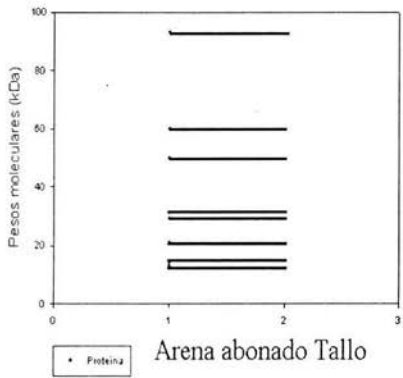
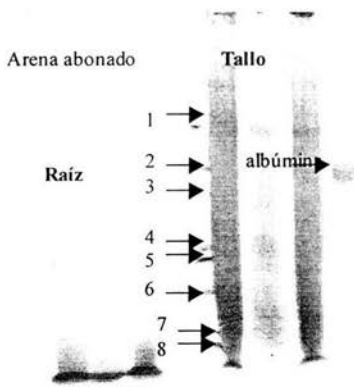
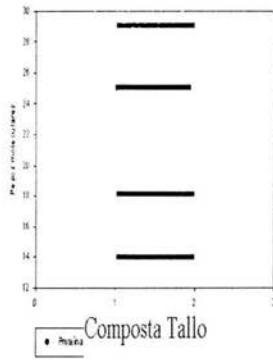
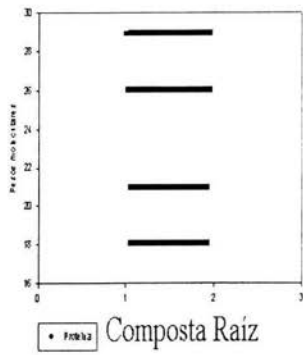
SUELO	PESO MOLECULAR EN kDa DE BANDAS EN TALLO	PESO MOLECULAR EN kDa DE BANDAS EN RAIZ	NUMERO DE GEL	NÚMERO DE BANDA	
				Tallo	Raiz
Vertisol abonado	32	No se observan bandas	1	1	
	19			2	
	16			3	
	13			4	
Composta	29	29	2	1	5
	25	26		2	6
	18	21			7
	14	18		3	8
				4	
Arena testigo	96	125	3	1	9
	51			2	
	35			3	
	25			4	
	22	21		5	10
	18			6	
	16	15		7	11
	13	13		8	12
Arena abonado	93	No se observan bandas	4	1	
	65			2	
	50			3	
	31			4	
	29			5	
	21			6	
	14			7	
	13			8	
Arena N, P	41			1	

	35	No se observan bandas	5	2	
	28			3	
	17			4	
	15			5	
Arena N, K	88	No se observan bandas	6	1	
	30			2	
	27			3	
	18			4	
	13			5	
	11			6	
Arena P, K	103	No se observan bandas	7	1	
	35			2	
	22			3	
	18			4	
	15			5	
	14			6	
	13			7	
Salino alcalino testigo	38	25	8	1	4
	25			2	
	14			3	
Salino alcalino abonado	105	31	9	1	10
	46			2	
	32			3	
	30			4	
	21			5	
	18			6	
	17			7	
	14			8	
	12			9	
Rojo Testigo	88			1	
	51			2	

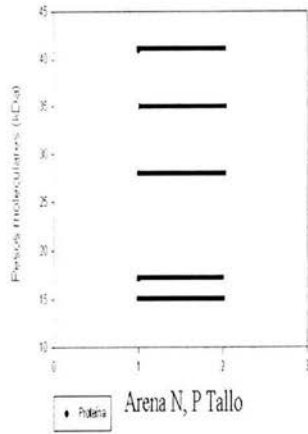
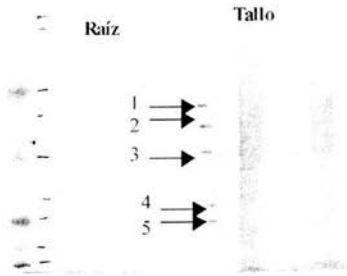
	41 35 15	No se observan bandas	10	3 4 5	
Rojo abonado	60 54 45 40 37 26 21	45 16 13	11	1 2 3 4 5 6 7	8 9 10
Rojo nitrogenado	36.940 30.458 28.190 19.915 13.542	No se observan bandas	12	1 2 3 4 5 6	
Marcador de peso molecular	60.0 50.0 40.0 30.0 25.0 20.0 15.0 10.0		10		

Grafico 7. Geles de poliacrilamida y pesos moleculares

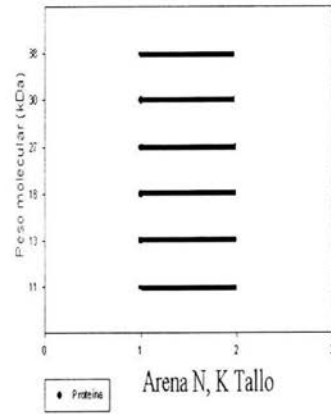
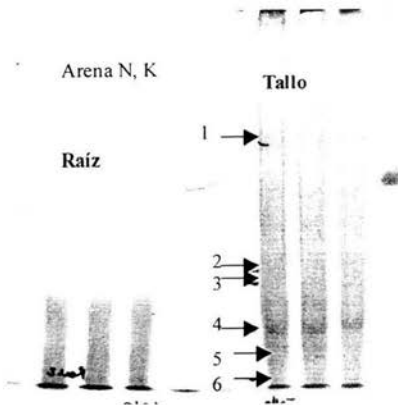


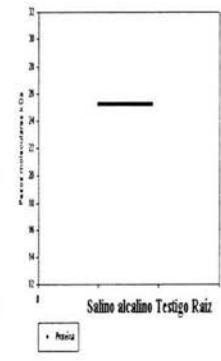
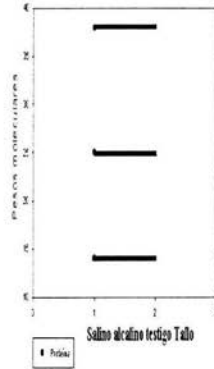
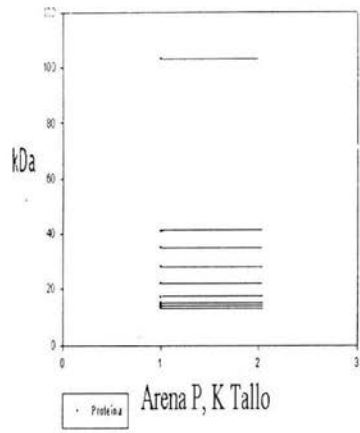
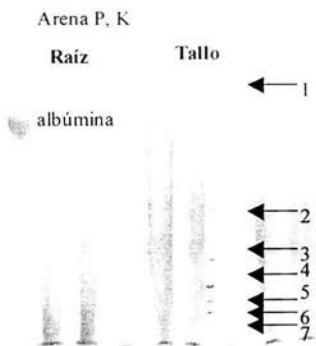


Marcador Arena N, P

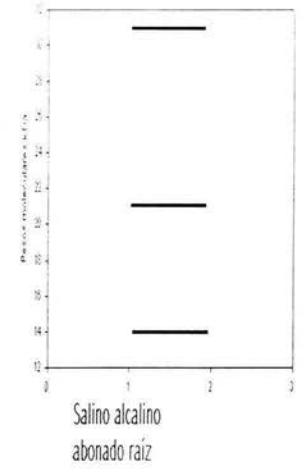
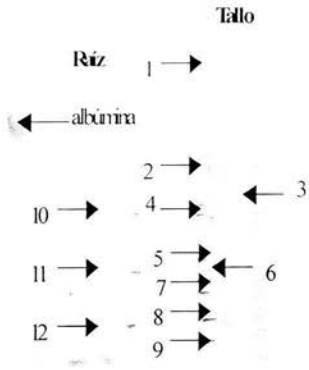


Arena N, K

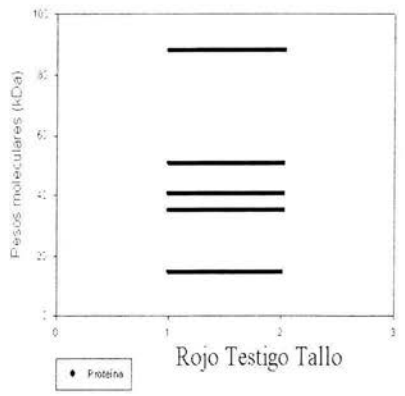
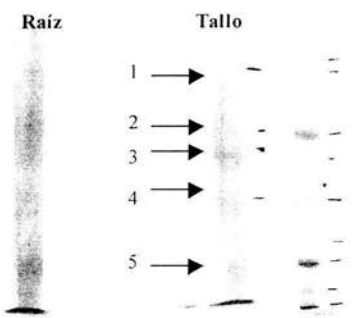




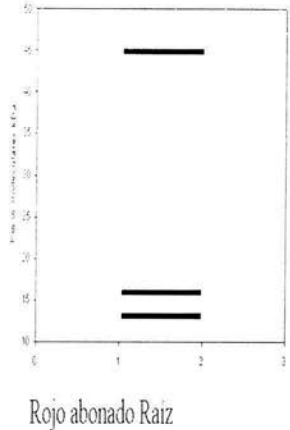
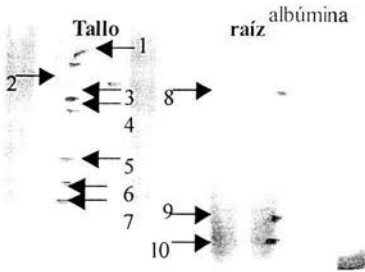
Salino alcalino abonado



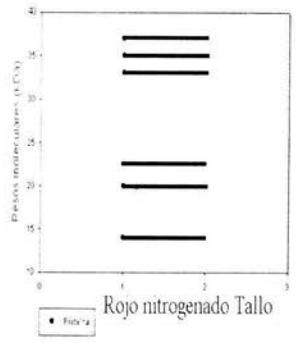
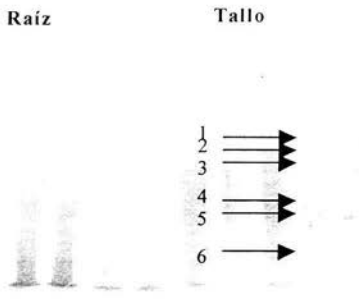
Rojo testigo



Rojo abónado



Rojo nitrogenado



PRUEBAS DE INDEPENDENCIA

a) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CORRELACION DE PESO vs SUSTRATO

H_0 : El peso de las plantas es independiente del suelo

H_A : El peso de las plantas es dependiente del suelo

$$\chi^2_{\alpha 0.05} = 19.675$$

Tabla No.14 Pesos de las plantas vs sustrato

SUSTRATO	PESO en gramos	
	Tallo	Raiz
Vertisol abonado	25.2	12.2
Composta	2.3	3.1
Arena Testigo	9.9	5.8
Arena abonado	16.0	9.0
Arena N, K	18.0	4.9
Arena P, K	7.9	5.5
Arena N, P	9.2	4.9
Salino alcalino testigo	3.0	1.0
Salino alcalino abonado	20.5	7.6
Rojo testigo	6.1	2.0
Rojo abonado	21.0	8.6
Rojo nitrogenado	6.5	4.1

$$\chi^2 = 4.6105$$

\therefore Se acepta H_0

b) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CORRELACION DE TAMAÑO DE LAS PLANTAS vs SUSTRATO

H₀: El tamaño de las plantas es independiente del suelo

H_A: El tamaño de las plantas es dependiente del suelo

$$\chi^2_{\alpha 0.05} = 19.675$$

Tabla No.15 Tamaño de las plantas vs sustrato

SUSTRATO	Tamaño de las plantas en cm	
	Tallo	Raíz
Vertisol abonado	42	45
Composta	18.5	17.5
Arena Testigo	22.0	38.8
Arena abonado	23.0	17.5
Arena N, K	32.5	17.3
Arena P, K	50.0	19.1
Arena N, P	49.0	17.3
Salino alcalino testigo	11.0	9.6
Salino alcalino abonado	11.0	9.5
Rojo testigo	39.8	34.7
Rojo abonado	40.2	29.0
Rojo nitrogenado	11.2	33.7

$$\chi^2 = 47.3696$$

∴ Se rechaza H₀

c) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CORRELACION DEL No. DE PROTEÍNAS vs SUSTRATO

Ho: El no. de proteínas de las plantas es independiente del suelo

HA: El no. de proteínas de las plantas es dependiente del suelo

$$\chi^2_{\alpha=0.05} = 19.675$$

Tabla No. 16 Número de Bandas vs sustrato

SUSTRATO	Número de Proteínas	
	Tallo	Raíz
Vertisol abonado	4	0
Composta	4	4
Arena Testigo	8	4
Arena abonado	8	0
Arena N, K	6	0
Arena P, K	7	0
Arena N, P	5	0
Salino alcalino testigo	3	1
Salino alcalino abonado	9	3
Rojo testigo	5	0
Rojo abonado	7	3
Rojo nitrogenado	5	0

$$\chi^2 = 18.1836$$

∴ Se acepta Ho

8. ANALISIS DE RESULTADOS

En el presente trabajo se utilizaron 5 tipos de suelos con 12 tratamientos diferentes, evaluando parámetros como: número de hojas, peso de la planta en el tallo y la raíz, tamaño de la raíz y del tallo, cuantificación de proteínas tanto en raíz como en tallo y número de proteína presentes en geles SDS-PAGE por muestra. Encontrando un cambio en la expresión proteica de la planta por medio de esta última técnica

El número de bandas varía de acuerdo al tipo de suelo y nutrición proporcionado.

En todos los tratamientos se observó la aparición de proteínas en el tallo, pues se sabe que la mayor parte de los procesos metabólicos se lleva a cabo en las hojas incluyendo el fenómeno de fotosíntesis, en tanto la aparición de proteínas en la raíz no es específica de algún suelo o tipo de nutrición proporcionada a la planta.

De acuerdo a los resultados el suelo influye en el crecimiento de la planta y observándose mayor desarrollo en el tratamiento del suelo arena P, K. Por el contrario el menor desarrollo se observó en el suelo salino alcalino testigo, siendo este tipo de suelo muy compacto y con exceso de sales sódicas lo que ocasiona desequilibrio osmótico al incrementar la absorción de sodio en el citoplasma de la planta provocando una muerte celular por inhibición en los procesos metabólicos.

En cuanto a la evaluación del número de hojas el tratamiento arena P,K es el que presenta el mayor número, obteniendo resultados similares al control, coincidiendo con lo reportado previamente por Böhm, (1974) en donde afirma que el desarrollo de las plantas de maíz se ve favorecida por fertilización con estos iones. Siendo nuevamente en este parámetro el salino alcalino testigo el suelo con menor número de hojas. Lo que concuerda con lo expuesto por Lynch et al. (1991) que afirma que la deficiencia de fósforo en plantas ocasiona la disminución en el número de hojas, al revisar la composición de este último tipo de suelo nos damos cuenta que es uno de los más pobres en cuanto a diversidad de

nutrientes por lo que era de esperar el tamaño pequeño de la planta así como su escaso número de hojas.

En base a la cuantificación de proteínas se puede señalar que el tratamiento de Arena Testigo y el Salino alcalino abonado son los que presentan mayor concentración de proteína con valores aproximados al control. Así mismo es en estos tratamientos donde se observa el mayor número de proteínas teñidas por azul Coomassie en los geles de poliacrilamida. Por otro lado los tratamientos con la menor concentración de proteína son: nuevamente el Salino alcalino testigo y el Rojo testigo.

La expresión en mayor a menor concentración de una proteína específica puede estar dada por factores como son: a) la etapa fenológica de la planta; pues se sabe que en el desarrollo del maíz existe una degradación de las proteínas principales de esta planta para utilizar los amino ácidos liberados y resintetizar las proteínas durante el transcurso del desarrollo de la planta (esto no es exclusivo de *Zea mays*).

b) El aumento en una proteína puede ser ocasionado por la degradación ineficiente de esta, para su utilización posterior o bien por el aumento en la traducción del gen que codifica dicha proteína.

Sin embargo la expresión de un gen determinado para la síntesis de una proteína se ve afectado por los factores ambientales y nutrimentales.

La disminución en la concentración de una proteína puede deberse a condiciones contrarias a las antes mencionadas, los genes de una proteína pueden estar expresados provocando la traducción y la síntesis de proteínas, sin embargo este proceso depende de factores nutrimentales que en un momento determinado pueden ocasionar un ineficiente proceso de síntesis (tal es caso de la deficiencia de fósforo en la generación de ATP para proporcionar energía necesaria para el funcionamiento de cualquier organismo, del nitrógeno en la síntesis de amino ácidos ó potasio en los procesos de fotosíntesis).

SUELOS

La concentración de iones en solución depende de la textura y composición de los suelos, la capacidad de intercambio iónico, la cantidad de agua y el pH siendo este último muy importante al establecer la disponibilidad de nutrientes para la planta.

Como se mencionó en la introducción como regla el crecimiento de la raíz es afectada por el pH en el rango de 5.0-7.5 por lo que los sustratos con estrés por este parámetro en el presente estudio son: Salino alcalino testigo, Salino alcalino abonado y composta. El efecto directo del pH es la inhibición del crecimiento de la raíz, quedando comprobado al analizar las raíces de los suelos mencionados, las cuales en promedio presentan una extensión menor que la de los otros sustratos.

Para el caso de los suelos salinos no sólo se ejerció un estrés por el porcentaje de sodio intercambiable sino además por el pH y el grado de compactación de estos suelos, pues se trata de suelos sumamente apretados lo que dificulta la penetración de las raíces y con ello la capacidad de esta para desarrollarse, buscar y absorber nutrientes. La capacidad de absorción de agua es muy limitada por lo que los suelos se vuelven pastos con una cantidad de agua muy pequeña. Cabe mencionar que este proceso ocurre por el alto grado de compactación del suelo lo que evita que el agua penetre al subsuelo quedando retenida en la superficie.

Al correlacionar los factores arriba mencionados, con el conocimiento de que las plantas como un mecanismo de tolerancia a sales tienden a almacenar sodio en las vacuolas y en el citoplasma pero solo en cantidades muy pequeñas pues la alta concentración intracelular ($> 10\text{mM}$) provoca la inhibición enzimática y con ello la actividad metabólica celular disminuye provocando la muerte celular de la planta. Esto sería una explicación del poco desarrollo de las plantas puestas en suelos salinos en nuestro trabajo. Sin olvidar que la toxicidad comienza con un desbalance de iones en los tejidos de la planta frecuentemente asociados con el exceso de Sodio.

Los suelos compuestos por arena, son suelos con una capacidad de ligar agua mucho mayor que el tipo de suelo anterior, su porosidad es mayor, favoreciendo el desarrollo de la raíz en busca de nutrientes, sin embargo el estrés que estos suelos ocasionan es por su alta neutralidad o debido a que presentan la característica de cargarse negativamente por sus condiciones físicas, lo que ocasiona que cationes como el potasio (K^+) tengan mayor disponibilidad mientras que los aniones como los grupos fosfato sean repelidos y queden atrapados en la fase líquida del suelo.

Los suelos rojos son suelos con una concentración muy alta de hierro lo que le da el color rojizo característico el estrés no solo se provoca por la alta concentración de hierro, sino además por el grado de compactación a pesar de tratarse de suelos menos compactos que los salinos no son adecuados para ser cultivados

Composta. Para el caso de este sustrato tratándose de un suelo rico en componentes orgánicos lo que le estaría proporcionando los nutrientes adecuados para el desarrollo de la planta el estrés que sufrió es por pH y la capacidad de ligar agua debido a la textura de este sustrato le impide un adecuado intercambio de cationes lo cual explica en cierta manera el porque la longitud de la raíz en la planta. Pues a pesar de estar estresada por pH el poco compactamiento del sustrato permitió su desarrollo en busca de nutrientes disponibles. Sin embargo el pH afectó drásticamente el desarrollo de la planta esto fue por la disponibilidad de ciertos nutrientes pero la poca disponibilidad de otros como se puede observar en la Fig. 2 lo que causó la inhibición en el desarrollo de la planta.

Al analizar los suelos suministrados con nitrógeno la relación entre el tallo y la raíz es muy grande (excepto en el control) lo que concordaría con lo reportado por Böhm et al. (1974) quien afirma que al suministrar nitrógeno a cultivo el desarrollo de la planta es mayor pero la relación tallo/raíz es desproporcional creciendo generalmente más el tallo (lo que queda plasmado en la Fig. No. 7).

Si analizamos los tratamientos testigo (arena, Solonetz, Rojo), es decir aquellos suelos con una baja o nula (en el caso de arena) cantidad de nutrientes disponibles, observamos que en

el arena el desarrollo de la planta fue menor que para los tratamientos restantes, en el caso de los Solonetz testigo y abonado presentan un desarrollo prácticamente idéntico, ello debido al estrés por el sodio presente en estos suelos lo que ocasiona su muerte celular como se explico arriba.

Para el caso de los suelos rojo testigo se desarrollo más que el abonado esperando que el resultado fuese lo contrario, si analizamos la figura 2 de disponibilidad de nutrientes encontramos que a pH mayor de 7.0 como es el caso para el rojo abonado (7.3) la disponibilidad de nutrientes empieza a disminuir gradualmente lo que pudo haber ocasionado esta desproporción en el crecimiento.

Una de las características que presentaron los suelos arena fertilizados con N, P, K fue la disminución del pH (Arena N, P. pH = 5.7, arena P, K. pH = 6.4, arena N, K pH = 5.6) y con ello la baja disponibilidad de Magnesio y Boro, pues a pH menor a 6.5 y mayor a 8.3 estos minerales se encuentran pobremente disponibles (remitirse a la fig. 2).

PROTEÍNAS.

Para realizar el análisis de las proteínas expresadas por las plantas se agrupo por el tipo de condiciones estresantes al que fueron sometidas obteniendo lo siguiente:

1. Plantas deficientes en Potasio

Arena testigo, Salino alcalino testigo, Rojo testigo, Arena N, P.

2. Plantas deficientes en Fósforo

Arena testigo, Salino alcalino testigo, Rojo testigo, Arena N, K.

3. Plantas deficientes en Nitrógeno

Arena testigo, Salino alcalino testigo, Rojo testigo, Arena P, K.

4. Plantas estresadas por alta concentración de sales

Salino alcalino testigo, Roo Testigo, Rojo nitrogenado

5. Plantas estresadas por pH

Composta, Salino alcalino testigo, Salino alcalino abonado, Rojo nitrogenado

6. Plantas abonadas

Salino alcalino abonado, Rojo abonado, Arena abonado.

A partir de esto se obtuvieron las proteínas que se encontraban en común encontrándose lo siguiente:

PM de la proteína KDa	Sustrato
13	Arena Testigo (Tallo y Raíz), arena N, K, Arena P, K, Arena abonado, Rojo abonado
14	Arena testigo, Salino alcalino testigo, arena P,K, Composta, Arena abonado, Salino alcalino abonado (Tallo y raíz), rojo nitrogenado
15	Rojo testigo, Arena N,P, Arena testigo, Arena P, K.
18	Arena testigo, Arena N,K, Arena P, K.
21	Composta (Raíz), Salino alcalino abonado, arena abonado, rojo abonado
22	Arena Testigo, arena P, K
25	Salino alcalino testigo, arena testigo, composta
35	Rojo testigo, Arena N,P, Arena testigo, Arena P, K
51	Arena testigo, Rojo testigo

- 88 Rojo testigo, Arena N, K.
103 Arena Testigo, arena P, K

Para la proteína de 14 KDa siendo expresada en la mayoría de los suelos y de acuerdo con la literatura es considerada como una proteína constituida del desarrollo de la planta encontrada dentro de la familia de vicilina.

La proteína de 15 KDa se expresa en plantas con disponibilidad de N, P, K pero además se expresa en plantas carentes de estos macronutrientes como son los tratamientos de arena testigo, y rojo testigo, no se puede pensar en una proteína por estrés por pH debido a que en los suelos donde las plantas expresaron esta proteína el pH esta en un rango normal o de no estrés, también se descarta que sea por un suelo muy compacto pues la expresión se da en arena donde el grado de compactación es mínimo para el desarrollo de la raíz. Para el caso de las proteínas de alto peso (>100 kDa) se considera que son globulinas que se generan en el desarrollo de la planta pues están reportadas como constitutivas(3).

La proteína de 18 KDa es mayoritariamente expresada en plantas crecidas en arena (con sus diversas fertilizaciones), recordando que los suelos arenosos poseen cargas negativas en donde se unen los cationes favoreciendo su asimilación, esta proteína sería indicativo de deficiencia por fósforo pues la forma asimilable de fósforo para la planta es en forma de anion (cargado negativamente) lo que ocasionaría que el suelo no permitiera la asimilación del nutriente por repulsión de cargas.

A pesar de que la proteína es expresada en un tratamiento con potasio y fósforo la presencia de la proteína no se debe considerar por la asimilación de fósforo pues sigue tratándose de un anión que va a ser lentamente asimilado por la planta.

La proteína de 21 KDa es característica de los suelos abonados, es probable que la expresión de la proteína se deba por una baja asimilación de fósforo, esto debido a el pH que tiene los suelos donde las plantas fueron cultivadas, si revisamos la disponibilidad que tiene este nutriente a los pH's de estos suelos tenemos que varias de 7.36 el menor que

corresponde al rojo abonado y 8.1 el más alto que corresponde a la composta, al tomar de referencia nuestra figura #2, se observa claramente que en el rango de pH de 7.0 a 8.5 la disponibilidad de este nutriente es mínima conduciendo con ello a un estrés por asimilación y no tanto por deficiencia del fósforo.

Las proteínas de 22 y 103 KDa son proteínas expresadas sólo en dos sustratos arena testigo y arena P, K por lo que nos conduce a que sean proteínas exclusivas en su expresión en las arenas, al analizar el contenido nutrimental de los suelos se observa que la carencia de nitrógeno es un parámetro predominante en ambos suelos, lo que conlleva a una expresión de la proteína por probable deficiencia de nitrógeno.

Para las proteínas de 35 y 15 KDa son proteínas que no aparecen en suelos con composta, pero tampoco aparecen en suelos con exceso de sodio como lo son los suelos salinos alcalinos. Observando que las plantas crecieron con N, P, K disponible pues las bandas se expresan en las plantas crecidas en arena fertilizada con estos macronutrientes, y que no se expresan en plantas crecidas en condiciones de salinidad, lo que se puede atribuir es que la expresión de estas bandas serían en conjunto por estrés de algún micronutriente, pues el pH donde crecieron las plantas esta debido de lo normal, por lo que no se puede pensar en una proteína por estrés de protones.

La proteína de 51 KDa se observa que se expreso en plantas deficientes de los tres principales macronutrientes (N, P, K), pero además no es expresada en ninguna planta cultivada en suelos con exceso de sodio como lo son los suelos salinos.

Para la proteína de 88 KDa se observa que es mayoritariamente expresada en suelos deficientes en fósforo, pues al revisar los tratamientos en los que se expreso la proteína el púnico en el que no se identifica es el arena testigo siendo este sustrato al igual que el rojo testigo y el arena N, K deficientes en este nutriente. Al no aparecer en el salino testigo que es el otro tratamiento deficiente de fósforo se atribuye a la alta concentración de sodio presente en el suelo, recordando que este tipo de suelos provoca la muerte celular muy rápido por la acumulación de sodio en la célula lo que conduce a una inhibición

enzimática, se sugiere que al provocarse la muerte celular no se alcanza un grado de estrés por fósforo que permita la expresión de la proteína.

Para abordar la discusión en el actual experimento es conveniente iniciar por el análisis de los parámetros físicos tomando como base en las técnicas estadísticas aplicadas. Abordando el análisis de las pruebas de Independencia para los parámetros de peso, tamaño y número de bandas con respecto al tratamiento de suelo se observa que los parámetros implicados con el desarrollo vegetal aérea dependen del tratamiento de suelo esto se debe a que no todos los diámetros de los tallos de las planta (dato no obtenido) fueron iguales. No así uno de ellos que es el peso total ya que en este se considero el desarrollo radicular y aéreo. Para los cual se realizó el análisis estadístico tomando en cuenta el peso del tallo y la raíz por separado no encontrando diferencia.

Sin embargo la diferencia en el desarrollo vegetativo aéreo se debe a las distintas condiciones químicas (Conductividad eléctrica, concentración e sales, pH, densidad) de los suelos, así como a las físicas (compactación, porosidad).

9. CONCLUSIONES

Se lograron establecer las condiciones físicas y químicas adecuadas para la homogenización, extracción y corrimiento electroforético de proteínas totales, lográndose la comparación del perfil proteico de las plantas crecidas en distintas condiciones nutrimentales; observándose una variación considerable en la expresión proteica de las plantas con respecto al control.

La concentración de los inhibidores (PVP 1.5%, Benzamida 1 mM, EDTA 10mM) dan buen resultado evitando la hidrólisis enzimática de proteínas.

Al cuantificar el contenido proteico se observa que las plantas sembradas en los sustratos Arena Testigo y Salino alcalino abonado presentan la concentración mas cercana al control, siendo de igual forma las plantas con mayor numero de proteínas presentes en los geles de poliacrilamida.

En base al análisis estadístico las condiciones de nutrientes y pH del sustrato influye en el estado fenológico de la planta de forma independiente del tiempo de desarrollo.

La concentración de proteína por gramo de tejido no presenta una variación estadística significativa con respecto a sustrato utilizado.

El análisis estadístico utilizado en este trabajo fue el adecuado, ya que nos permitió la comparación del efecto que tiene el suelo sobre las características físicas de las plantas.

Con el conocimiento de que en sistemas biológicos el estrés por algún nutriente provoca la regulación génica, nos permite dilucidar que los cambios en la expresión proteica que se pueden atribuir a una posible deficiencia de algún nutriente no necesariamente se debe a la baja concentración del mismo, si no que está influenciado por el pH, componentes y textura del suelo que determinen la disponibilidad del mismo.

10. Anexo

Nitrógeno: se utilizó urea, cada planta requiere 2.56 g de Nitrógeno, la urea contiene 46% de nitrógeno; entonces $(2.56\text{g/planta}) * (100/46) = 5.56\text{g}$ por planta, disueltos en 50ml de agua.

Fósforo: se utilizó superfosfato triple, cada planta requiere 0.27 g de fósforo, el fertilizante contiene 46% de fósforo, entonces $(0.27 \text{ g/ planta}) * (100/46) = 0.5869 \text{ g}$ de superfosfato disueltos en 50 ml de agua por planta.

Potasio: se utilizó cloruro de potasio, la planta requiere de 0.65g de potasio, el fertilizante contiene 52% de potasio, entonces $(0.65\text{g/planta}) * (100/52) = 1.25\text{g}$ de KCl/planta disueltos en 50 ml de agua.

Los suelos con composta se prepararon con 50% (v/v) de materia orgánica.

11. REFERENCIAS

- 1.- Aguirre Gómez Arturo, Química de los suelos salinos y sódicos, UNAM, México (1993), pp 31-127.
- 2.- Centro de Investigación agrarias. El cultivo del maíz en México, México (1980). pp 11, 17,18,20.
3. Kigel Jaime, Galili Gad, Seed development and germination, Ed.Marcel Dekker INC, New York (1995), pp 45-95,282-309.
4. Walpole Ronald E., Raymond H. Myers, Probabilidad y Estadística Mc. Graw-Hill, 4ed, México (1992), pp 35-361
5. Sengbusch Peter V., Storage proteins, 29 de julio de 2003,
- 6.- Bartolini Roberto, El Maíz, Ed. Mundi-Prensa, Madrid(1990), p. 9
- 7.- Black C. A., , Relacione Suelo-Planta, Ed. Hemisferio Sur, Argentina(1975), p. 82-95
- 8.- Wayne W. Daniel, , Base para el análisis de las ciencias de la salud, Limusa-Wiley, México DF. (2002), 4ed. pp. 588-597.
9. Spenser Donald and Higgins T.J.V., Button Susan C., and Davey Ross A. (1980). Pulse-labeling Studies on Protein Synthesis in Developing Pea Seeds and Evidence of a Precursor form of Legumin Small Subunit. Australia. *Palnt Physiology*, **66**, 510-515.
10. Higgins V Thomas Joseph,. and Spencer Donald (1981). Precursor Forms of Pea Vicilin Subunits. Australia. *Palnt Physiology*. **67**, 205-211.

11. Spencer D. (1984). The physiological role of storage proteins in seeds. Australia. Phil. Trans. R. Soc. Lond. **304**, 275-285
12. V. Higgins Thomas J., Chandler Peter M., Spenser Donald, Randall Peter J., Beach Larry R., Blagrove Robert J., Kort Alexander A., and Inglis Adams S.. (1986). Gene Structure, Protein structure, and regulation of the Synthesis of a Sulfur-rich Protein in Pea Seed. USA. The Journal Biological Chemistry, **261**, (24), 1124-1130.
13. Castillo Josefa, Rodrigo M. Isabel, Márquez José A., Zúñiga Ángel and Franco Luis, (2000), A pea nuclear protein that is induced by dehydration belongs to the vicilin superfamily, European Journal of Biochemistry **267**, 2156-2165.
14. Rosales-Serna Rigoberto, Kohashi-Shibata Joseé, Acosta-Gallegos Jorge Alberto, Trejo-López Carlos, Ortiz-Cereceres Joaquín, Kelly James D., (2004), Biomass distribution, maturity acceleration and yield in drought-stressed common bean cultivars, Fiel Crops Researc. Gto. México **203**, 11-15.
15. Tian C.Y., Feng G., Li X.L., Zhang F.S., (2003), Different effects of arbuscular mycorrhizal fungal isolates from saline or non-saline soil on salinity tolerance of plants, Applied Soil Ecology, China (22 of April)
16. Vicente Oscar, Boscaiu Monica, Natranjo Miguel Angel, Estrelles Elena, Belles Jose María, Soriano Pilar. (2003), Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae), Valencia España, (8 of December).
17. M. Ashraf, P. J. C. Harris, (2004), Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants, , Palnt Science, Pakistan **166**, 3 –16.
18. Rapala-Kozik Maria, Ostrowska Katarzyna, Bednarczyk Katarzyna, Dulinski Robert and Kozik Andrzej (2003), Polypeptide Components of Oligomeric Legumin-Like

Thiamin-Binding Protein from Buckwheat Seeds characterized by Photoaffinity labeling, *Journal of Chemistry* **22**, (2), 167-172.

19. Borisjuk Panitz r, L, Wobus U, Manteuffel R, (1995). Transient expression of storage protein genes during early embryogenesis of *vicia-faba* synthesis and metabolization of vicilin and legumin in the embryo, suspensor and endosperm, *Planta* **196** (4), 756-774

20. Duce V, Richard J, Saulnier P, Popineau Y, Boury F (2004), Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets, *Colloids and surfaces a-physicochemical and engineering aspects* **232** (2), 239-247.

21. Yamagata T, Kato H, Kuroda S, Abe S, Davies E (2003), Uncleaved legumin in developing maize endosperm: identification, accumulation and putative subcellular localization, *Journal of Experimental Botany* **54** (384), 913-922.

22. Landry J. (2003), Quantitation of zeins from the lysine content of grain, endosperm and glutelins of maize, *Maydica*, **48** (1), 39-54.

23. Appleton Bonnie, Koci Joel, French Susan, Lestyan Miklos and Harris Roger (2003), Mycorrhizal Fungal Inoculation of established street trees, *Journal of Agriculture* **29** (2) 107-110.

24. M. Cabelguenne, P. Debaeke, A. Bouniols (1999), EPICphase, a version of the EPIC model simulating the effects of water and nitrogen stress on biomass and yield, taking account of developmental stages: validation on maize, sunflower, sorghum, soybean and winter wheat, *Agricultural Systems* **60**, 175-196.

25. Castillo Josefa, Rodrigo M. Isabel, Marquez Jose A., Zúñiga Angel and Franco Luis (2000), A pea nuclear protein that is induced by dehydration belongs to the vicilin superfamily, *European Journal of Biochemistry* **267** (8), 2156-2165

26. Schortemeyer Marcus, Stamp Peter and Feil Boy (1997), Ammonium Tolerance and Carbohydrate Status in Maize cultivars *Annals of Botany* **79**, 25-30.
27. Chandler Peter M., Spenser Donald, Randall Peter J., and V. Higgins Thomas J., (1983). Influence of Sulfur Nutrition on Developmental Patterns of Some Major Pea Seed Proteins and Their mRNAs. Australia. *Plant Physiology*, **75**, 651-657.
28. Davey R. A., V. Higgins T. J. and Spencer D (1981), Homologies between two small subunits of vicilin from *Psium Sativum*, *Biochemistry International*, **3**, (6), 595-602.
29. Adamek-Swierzczynska Slywia, Kozik Andrzej (2002), Multiple thiamine-binding proteins of legume seeds. Thiamine-binding vicilin of *Vicia Faba* versus thiamine-binding of *Psium Sativum*, *Plant physiology and Biochemistry* **40**, 735-741
30. Informaciones agronómicas, Instituto de la potasa y el fósforo (1996), **1**, (6) 1-8.
31. Tabe Linda, Hagan Nicholas and Higgins V. T.J. (2002), Plasticity of seed protein composition in response to nitrogen and sulfur availability. Australia. *Plant Bioogy*. **5**. 212- 217
32. Informaciones agronómicas, Instituto de la potasa y el fósforo (2000), **4**, (2) 1-3.
33. Informaciones agronómicas, Instituto de la potasa y el fósforo (1995), **1**, (3) 1-4.
34. Informaciones agronómicas, Instituto de la potasa y el fósforo (1997), **2**, (3) 1-10.
35. Spencer Donald and Higgins V. T. J. (1980), The biosynthesis of legumin in Maturing Pea Seeds, *Biochemistry International*, **1**,(5), 502-509.

36. Tabe Linda M., and Droux Michael (2002). Limits to sulfur accumulation in transgenic Lupin Seeds expressing a Foreign Sulfur-Rich Protein, *Plant Physiology* **128**, 1137-1148.
37. Novak Viliam, Vidovic Jozef (2003). Transpiration and nutrient uptake dynamics in maize (*Zea mays L.*). *Ecological Modelling* **166**. 99-107.
38. Campalans Anna, Messeguer Ramon, Goday Adela, Pages Montserrat (1999). Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins, *Plant Physiology Biochem.* **37**, 327-340
39. Song Renato and Messing Joachim (2003), Gene expression of a gene family in maize bases on noncollinear halotypes, *Plant biology*, **100**, (15), 9055-9060
40. N. Katalin Barabás, Rusten T. Omarov, László Erdei, S. Herman Lips (2000), Distribution of the Mo-enzymes aldehyde oxidase, xanthine dehydrogenase and nitrate reductase in maize(*Zea mays L.*) nodal roots as affected by nitrogen and salinity, *Plant Science* **155**, 49-58.
41. Messiaeu Johan, Van Cutsen Pierre (1999), Polyamines and pectines. II. Modulation of pectic-signal transduction, *Planta* **208**, 147-256.
42. Keegtra Kenneth and Thomashow Michael (2002), Physiology and metabolism Adapting physiology and metabolism to changes in the environment, *Plant Biology* **5**. 191-192.
43. Huei Kao Ching (1997), Physiological significance of stress-induced changes in polyamines in plants, *Bot. Bull. Acad. Sin.* **38**, 141-144
44. S. Boscolo Patricia R., Menossi Marcelo, Renato A Jorge (2003), Aluminium-induced oxidative stress in maize, *Phytochemistry* **62**, 181-189.

45. Ragan M. Callaway, R. W. Brooker, Chofer Philippe, Kikvidze Zaal, Lortie Christopher J., Michalet Richard, Paolini Leonardo, Pugnaire Francisco I., Beth Newingham, Aschehoug Erick T., Armas Cristina, J. Cook David and Bradley. (2002), Positive interactions among alpine plants increase with stress, *Nature* **417**, 844-848.
46. Ping Yu Shan, Canzoniero Lorella MT and W. Choi Dennis (2001), Ion Homeostasis and apoptosis, *Cell Biology* **13**, 405-411.
47. Yokoi Shuji, Bressan Ray A. and Hasegawa Paul Mike (2002). Salt stress Tolerance of plants, *JIRCAS* 25-33.
48. Grossman Arthur and Takahasi Hideki (2001), Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 163-210.
49. Christine Fox Tama and Lou Guerinot Mary (1998), Molecular Biology of cation Transport in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 669-696.
50. Serrano Ramon and Rodriguez-Navarro Alonso (2001), Ion homeostasis during salt stress in plants, *Cell Biology* **13**, 399-404.
51. Wallace William, Oaks Ann (1997), Hydrolysis of endosper storage protein in *Zea mays*: in vitro modification of an early endopeptidase, *Plant Science* **124**, 9-14.
52. Aroca Ricardo, Vernieri Paolo, Irigoyen Juan Jose, Sánchez-Díaz Manuel, Tognoni Franco, Pardossi Alberto (2003), Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (*Zea mays L.*) in avoiding chilling-induced water stress, *Plant Science* **165**, 671-679.
53. Zacchini Massimo, Rea Elvira, Tullio Monica and de Agazio Marina (2003), Increased antioxidative capacity in maize calli during and after oxidative stress induced by a long lead treatment, *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**, (1), 49-54.

54. Høgh-Jensen Henning, K. Schjoerring Jan and Jean-Francois Soussana (2002), The influence of Phosphorus Deficiency on Growth and Nitrogen Fixation of White Clover Plants, *Annals of Botany* **90**, 745-753.
55. Pandey, G.K. Reddy, MK. Sopory, SK Singla-Pareek (2002), Calcium homeostasis in plants; role of calcium binding proteins in abiotic stress tolerance, *Ind. J. Biotechnology* **1**, 135-157.
56. J.P. Lilly (1995), Best Management Practices for agricultural nutrients, *Soil Feats AG*-439-20, 1-7.
57. Mahammad Pessaraki, *Handbook of plant and crop stress*, Ed. Dekker USA8 (2000), pag 78-105.
58. Buchanan Grissem Jones, *Biochemistry and Molecular biology of plants*, American Society of Plants Physiologists, USA(2000) pag 545-675, 1050-1521.
59. Horst Marschner, *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2da. Ed, Academic Press, USA 1995, pag 201-434.
60. Raven, J. A. and Smith, F. A. (1976), Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation, *New Phytology* **76**, 415-431.
61. Cramer, M.D., Lewis, O. A. M and Lips, S.H. (1993). Inorganic carbon fixation and metabolism in maize roots as affected by nitrate and ammonium nutrition, *Physiology Plant* **89**, 623-639.
62. Layzell, D. B., Gaito, S. T. and Hunt, (1988). Model of gas exchange and diffusion in legume nodules. I. Calculation of gas interchange rates and the energy cost of water fixation. *Palnta* **173**, 117-127.

63. Peoples, M.B., and Caswell, E. T. (1992). Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant soil* **141**, 13-39.
64. Smirnov, N. and Stewart, G. (1985). Nitrate assimilation and translocation by higher plants: comparative physiology and ecological consequences. *Physiology Plant* **64**, 133-140
65. Osmond, C. B. (1976). Acid metabolism in *Atriplex*. I. Regulation in oxalate synthesis by the apparent excess cation absorption. *Aust. J. Biol. Sci.* **20**, 575-587.
66. Curtis Helena, Sue Barnes N., *Biología*, 6ta., Panamericana, México(2000), pag. 983-1004.
67. Bonner James, Varner Joseph E., *Plant Biochemistry*, 3ed, Academic Press, USA (1976), pag 561-612.
68. Millard, P. (1988). The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant Cell Environment* **11**, 1-8
69. Flowers, T. J. Troke, P.F. and Yeo, A.R. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiology* **28**, 89-121.
70. Flowers, T. J, and Lauchli, A. (1983). Sodium versus Potassium: Substitution and compartmentation. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, 15B, pp 651-681. Springer-Verlag, Berlin.
71. Rufty, T. W. jr. Jackson, W.A. and Raper, C. D. Jr. (1981). Nitrate reduction in roots as affected by presence of potassium and by flux of nitrate through the roots. *Plant Physiology* **68**, 605-609.
72. Böhm, W.(1974). Phosphatdüngung und Wurzelwachstum. *Phosphorsaure* **30**, 141-157

73. Neumann, P. M., Ehrenreich, Y and Golab, Z. (1983). Foliar fertilizer damage to corn leaves: relation to cuticular penetration. *Argon J. Plant Nutrition* **5**, 1209-1215.
74. Neumann, P. M., van Volkenburg, E and Cleland, R. E. (1988). Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. *Plant Physiology* **88**, 233-237.
75. M. Orcutt David, T. Nilsen Erick, *Physiology of Plants under Stress soil and biotic factors*, Jhon Wiley and Sons, INC, New York (2000) 46-62, 199-281.
76. Deutscher Murray P., *Methods in enzymology, Guide to protein Purification*, Academic Press, USA (1990). Vol. 182., pag. 50-67, 174-193, 425-440.
77. Khamis, S., Lamaze, T., Lemoine, Y. and Foyer, C. (1990). Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation. Relationship between electron transport and carbon assimilation. *Plant physiology* **94**. 1436-1443.
78. Rincon, M. and Hanson, J. B. (1986). Controls on calcium ion fluxes in injured or shocked corn root cell: importance of proton pumping and cell membrane potential. *Physiology Plant* **67**, 576-583.
79. Spencer D., Chandler Peter M., V. Higgins Thomas J., Inglis Adam S. and Rubira Michael, (1983), Sequence interrelationships of the subunits of vicilin from pea seeds, *Plant Molecular Biology* **2**, 259-267.
80. Badenoch-Jones Jane, Spencer Donald, V. Higgins T. J., and Millerd Adele (1981), The role of glycosylation in storage-protein synthesis in developing pea seeds, *Plant* **153**, 201-209.

81. García Flores Cristina, Aguilar Raúl, Reyes de la Cruz Homero, Albores Martha and Sánchez Estela (2001), A maize insuline-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein síntesis in maize, *Biochemical J.* **358**, 95-100.

82. Parra Oaxaca Alberto Luis Efecto del Paclobutrazol en *Solanum Tuberosum* bajo condiciones de invernadero, FES-Cuautitlan, 2001, pag 67.

83.-<http://www.abcagro.com/herbaceos/cereales/maiz.asp>

84. <http://omega.ilce.edu.mx>