

CAMBIOS FÍSICO-QUÍMICOS DURANTE LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ*

PHYSICAL-CHEMICAL CHANGES DURING MAIZE SEED GERMINATION

Ma. Isabel Sánchez-Pérez¹, Carmen Yazmín Muñoz-Mejía¹, Jesús Di Carlo Quiroz-Velásquez¹, Netzahualcoyotl Mayek-Pérez¹ y José Luis Hernández-Mendoza^{1§}

¹Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Maestro s/n. Esq. Elías Piña. Col. Narciso Mendoza. C. P. 88710. Reynosa, Tamaulipas, México. Tel. 01 555 7296000 y 01 899 9243627. Ext. 87749 y 87714. (msanchezp0700@ipn.mx), (jquiroz@ipn.mx), (nmayekp@ipn.mx). [§]Autor para correspondencia: jhernandezm@ipn.mx.

RESUMEN

Se determinaron los cambios físico-químicos que ocurren en el medio de germinación de la semilla de maíz (*Zea mays* L.) *in vitro*. Se colocaron 10 semillas del híbrido 83G66 en cajas petri con 9 mL de agua desionizada estéril e incubadas para su germinación. A la solución resultante después de la germinación se determinó el pH y los contenidos de triptófano, kinetina, benciladenina, ácido indolacético, ácido antranílico y ácido giberélico por medio de cromatografía de líquidos de alta presión. Durante la germinación el pH del medio se redujo de 6.9 a 4.8 y se produjo triptófano y pequeñas cantidades de ácido indolacético, ácido antranílico, kinetina, ácido giberélico y benciladenina. La presencia de los compuestos detectados podría favorecer el crecimiento inicial al maíz.

Palabras clave: *Zea mays* L., ácido antranílico, ácido indolacético, crecimiento vegetal, triptófano.

ABSTRACT

The aim of this research was to determine the physical-chemical changes that occur in the medium during the germination of maize seed (*Zea mays* L.) *in vitro*. Ten seeds of the hybrid 83G66 were incubated to germination in *petri* dishes with 9 mL of deionized sterile water. During germination pH changes, indolacetic acid, anthranilic

acid, kinetin, gibberelic acid and benciladenine content were determined in the solution by liquid high-resolution chromatography. During germination the pH of the medium was significantly reduced from 6.9 to 4.8. Tryptophan and small quantities of indolacetic acid, anthranilic acid, kinetin, gibberelic acid and benciladenine were detected. The presence of the compounds detected might favor early maize growth.

Key words: *Zea mays* L., anthranilic acid, indolacetic acid, plant growth, tryptophan.

En la región norte del estado de Tamaulipas, México se cultivan entre 80 000 y 100 000 ha con maíz (*Zea mays* L.) (SIAP, 2008). En esta región los suelos predominantes son alcalinos y el pH del agua de riego es alto. El agua modifica las propiedades físico-químicas de la rizósfera y el pH de la solución del suelo donde germinan las semillas (De Mendonça *et al.*, 2005). Los iones cloruro inhiben la germinación y síntesis de proteínas del maíz, trigo (*Triticum aestivum* L.) y ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) (Román-Palacios, 2000). Como estrategia para reducir los daños por salinidad y otros factores adversos, aproximadamente 10% de la superficie se inocula con hongos micorrízicos (HM) (*Glomus intrarradicens*) o con la rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (RPCV) *Azospirillum brasilense* (García-Olivares *et al.*, 2008). Los HM y las RPCV

* Recibido: marzo de 2009
Aceptado: marzo de 2010

incrementan de 12 a 36% y de 15 a 35% respectivamente, el rendimiento de grano del maíz en comparación con plantas no inoculadas (Díaz-Franco *et al.*, 2005; García-Olivares *et al.*, 2007). Además, los HM y las RPCV favorecen la movilización de P y la fijación de N y reducen la necesidad de fertilizantes químicos.

Durante la germinación de la semilla se liberan exudados radiculares que favorecen la asociación de la planta con los microorganismos del suelo. Estos a su vez liberan en la rizósfera auxinas y citocininas que son promotoras del crecimiento vegetal (Walker *et al.*, 2003; Kamilova *et al.*, 2006). El éxito de la asociación entre las plantas y los microorganismos está influenciada de manera determinante por la relación agua-suelo-planta-microorganismos y de ella depende la productividad de los cultivos. En esta investigación se analizaron los cambios físico-químicos del medio durante la germinación de semilla de maíz *in vitro*.

En el primer experimento, se colocaron en un tubo de ensayo de 18*150 mm dos semillas del híbrido 83G66 (Pioneer®) y se agregó 3 mL de agua desionizada estéril. Posteriormente, se registró la cantidad de agua embebida y se midió el pH del agua con un potenciómetro modelo pHmeter 440 (Corning®) durante cuatro días. El equipo se calibró con los amortiguadores comerciales de pH= 4 y pH= 7 (Micro Essential Laboratory; Brooklyn, EUA). En el segundo experimento se colocaron 10 semillas de maíz en una caja petri con 9 mL de agua desionizada estéril y el pH del medio se determinó durante cuatro días.

En los dos experimentos, cada tratamiento se repitió 10 veces, mismas que se incubaron con un fotoperiodo de 12 h luz-obscuridad a 25 ± 2 °C. A la solución resultante después de la germinación de las semillas se le determinaron las cantidades presentes de triptófano, kinetina, benciladenina, ácido indolacético (AIA), ácido antranílico (AA) y ácido giberélico (AG) por medio de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC, Hewlett Packard® modelo 1100, Ramsey, EUA) de acuerdo con el procedimiento de Hernández-Mendoza *et al.* (2008), que consiste en tomar 4 mL de solución de cada caja petri y filtrarla con acrodiscos® LC PVDF con membranas de 0.45 µm de porosidad y 25 mm de diámetro interno.

Posteriormente, la muestra se inyecta al HPLC previamente acondicionado y calibrado con concentraciones conocidas

de cada una de los metanolitos por analizar. Para ello, se utilizó una columna RP-18 de 150 mm de largo, 4.6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil fue acetonitrilo-fosfato 30/70 y se usó un volumen de inyección de 20 µL. El detector se ajustó a una longitud de onda de 220 nm. A los valores observados se les calculó la media \pm error estándar por fecha de muestreo. La información se sometió al análisis de regresión lineal simple donde la variable independiente fue el tiempo de incubación y la dependiente, el pH del agua.

Las semillas de maíz se embebieron con agua e incrementaron su peso fresco durante las primeras 48 h en incubación. El peso fresco más alto se observó a las 24 h. El volumen de agua retenido por la semilla alcanzó hasta 200 µL a las 48 h en incubación; en contraste, el peso seco total de la semilla se redujo debido a la utilización de las reservas del endospermo para la germinación, las líneas verticales indican el promedio de diez repeticiones \pm error estándar (Figura 1). A continuación, la semilla inició la germinación con el crecimiento de la radícula y del coleóptilo (Figura 2), durante este proceso disminuyó el pH del medio (Figura 3). El análisis por cromatografía (Figura 4) mostró la presencia de triptófano a las 24 h en incubación y pequeñas cantidades de AIA, AA, kinetina, benciladenina y AG (Cuadro 1).

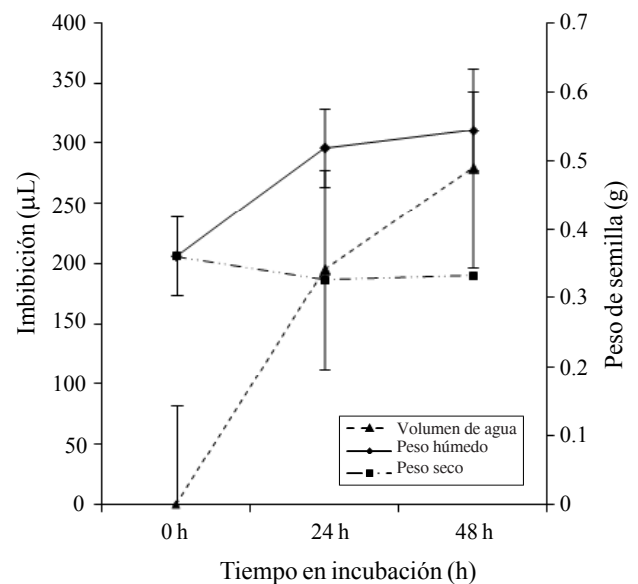


Figura 1. Volumen de agua embebida, peso fresco y seco de semillas de maíz (83G66 Pioneer®) durante la germinación *in vitro*.



Figura 2. Desarrollo de radícula y coleótilo del maíz híbrido 83G66 germinada *in vitro*.

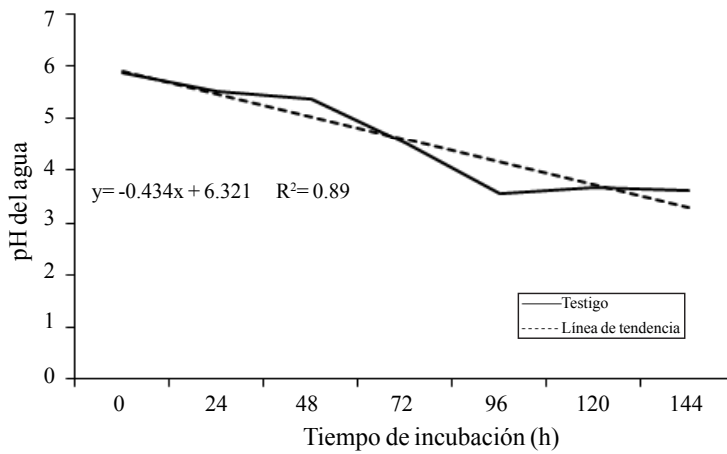


Figura 3. pH de la solución durante la germinación de semillas de maíz híbrido 83G66.

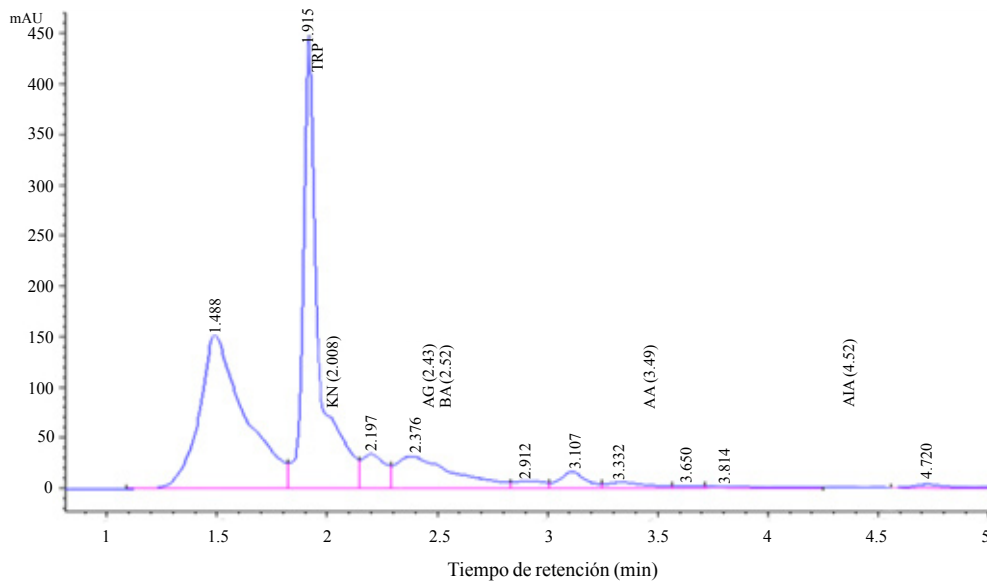


Figura 4. Cromatograma HPLC a 48 h de incubación de semillas de maíz híbrido 83G66. TRP= triptofano; KN= kinetina; AG= ácido giberélico; BA= benciladenina; AA= ácido antranílico y AIA= ácido indolacético.

Cuadro 1. Metabolitos en el medio de germinación. Semillas de maíz 83G66 (Pioneer®) a diferentes tiempos de incubación.

Metabolitos	Tiempo en incubación (h)			
	0	24	48	72
Triptófano (ppm)	0.83	14.62	2.95	3.86
Ácido indolacético (ppm)	nd	0.09	nd	nd
Ácido antranílico (ppm)	nd	nd	0.05	nd
Kinetina	nd	nd	nd	traza
Benciladenina	nd	nd	traza	nd
Ácido gibérelico	traza	nd	nd	traza

nd= no detectado por el HPLC; traza= compuestos detectados con un área ≤ 26.9 .

Las semillas incrementaron el peso fresco durante las primeras 48 h en incubación, los valores más altos se observaron a las 24 h; el peso seco se redujo debido a la utilización de las reservas del endospermo para la germinación y crecimiento de la radícula y del coleóptilo (Cruz-Pérez *et al.*, 2003; Méndez-Natera *et al.*, 2008). Durante la germinación, la semilla del maíz acidificó el agua del medio, similar a lo observado por Vitoria y Méndez-Natera (2007), aunque al parecer este cambio no se asocia con el vigor de la semilla de maíz. La germinación involucra cambios a nivel celular y genético como la hidratación de proteínas, respiración, proliferación celular o la activación de genes para la liberación de exudados (Walker *et al.*, 2003). Durante la germinación del cacahuete (*Arachis hypogea* L.) se producen 11 compuestos fenólicos entre los cuales el más abundante es el ácido clorogénico (Reddy *et al.*, 1977); mientras que en hortalizas se ha detectado, triptófano, azúcares y ácidos (cítrico, succínico, málico y clorogénico) (Kamilova *et al.*, 2006).

En esta investigación se detectaron triptófano y pequeñas cantidades de otros cinco metabolitos (AIA, AA, kinetina, BA y AG), almacenados en el endospermo de la semilla (Mendoza-Elos *et al.*, 2006) y en su mayoría auxinas y citocininas promotores del crecimiento vegetal y de la asociación entre las plantas con los microorganismos benéficos del suelo (Walker *et al.*, 2003; Kamilova *et al.*, 2006).

Durante la imbibición de la semilla, entran solutos disueltos en la solución del suelo y el agua es retenida principalmente por las proteínas, celulosa y sustancias pépticas. El almidón aunque presente, no absorbe o retiene agua en las mismas proporciones (Román-Palacios, 2000).

El estrés salino o la inoculación con hongos no fitopatógenos, como el *Penicillium notatum* incrementan la exudación de carbono soluble y de metabolitos que podrían favorecer el crecimiento vegetal en *Lolium perenne* L. Las RPCV como la *A. brasilense* producen fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico) que promueven el crecimiento vegetal (Walker *et al.*, 2003; Bais *et al.*, 2006). De Mendonça *et al.* (2005), observaron que con presencia de nitrógeno en forma de nitratos, el pH de la solución nutritiva donde se sembró con arroz (*Oriza sativa* L.) se alcalinizó, pero la presencia de nitrógeno en forma de amonio la acidificó. Las variedades de arroz tolerantes a la toxicidad por aluminio absorben más protones de la solución nutritiva en presencia de nitrato y menos protones en presencia de amonio, de manera que el balance de protones y el cambio del pH permiten asimilar poco aluminio y tolerarlo. Los iones cloruro inhiben en mayor proporción la germinación y síntesis de proteínas del maíz, trigo y ajonjolí que los acetatos (Román-Palacios, 2000).

Entre las causas probables de la acidificación del medio durante la germinación de la semilla del maíz podría incluirse la liberación de metabolitos tales como: triptófano, AIA, AA y AG, así como otros ácidos orgánicos (Kamilova *et al.*, 2006; Mendoza-Elos *et al.*, 2006). Para las condiciones de cultivo del maíz en el norte de Tamaulipas, México; donde existe alta prevalencia de suelos alcalinos (Díaz-Franco *et al.*, 2005; García-Olivares *et al.*, 2008), la liberación de metabolitos podría favorecer la acidificación de la rizósfera y facilitar el proceso de germinación, desarrollo inicial del cultivo, así como el rendimiento biológico final del cultivo (Biasutti y Galiñanes, 2001; Laynez-Garsaball *et al.*, 2007). Por lo tanto, es probable que las RPCV favorezcan el establecimiento de las asociaciones planta-microorganismo promotores del crecimiento vegetal.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el Instituto Politécnico Nacional (IPN) y el Patronato para la Investigación, Fomento y Sanidad Vegetal A. C. Ma. Isabel Sánchez-Pérez y Carmen Yazmín Muñoz-Mejía fueron becarias PIFI-IPN y CONACYT. José Luis Hernández-Mendoza y Netzahualcoyotl Mayek-Pérez fueron becarios COFAA-IPN y EDI-IPN. Así como el último autor es becario del Sistema Nacional de Investigadores (SNI).

LITERATURA CITADA

- Bais, H. P.; Weir, T. L.; Perry, L. G.; Gilroy, S. and Vivanco, J. M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:233-266.
- Biasutti, C. A. y Galiñanes, V. A. 2001. Influencia del ambiente de selección sobre la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) bajo estrés hídrico. Relaciones entre caracteres de plántula con el rendimiento a campo. *AgriScientia* 18:37-44.
- Cruz-Pérez, A. B.; González-Hernández, V. A.; Mendoza-Castillo, M. C. y Ortega-Delgado, M. L. 2003. Marcadores fisiológicos de la tolerancia al envejecimiento de semilla en maíz. *Agrociencia* 37:371-381.
- De Mendonça, R. J.; Cambraia, J.; Oliva, M. A. y Alves O. J. 2005. Capacidade de cultivares de arroz de modificar o pH de soluções nutritivas na presença de alumínio. *Pesq. Agropec. Bras.* 40:447-452.
- Díaz-Franco, A.; Alvarado-Carrillo, M.; Cantú-Almaguer, M.A. y Garza-Cano, I. 2005. Fertilización biológica y producción de maíz en la región semiárida del norte de Tamaulipas, México. *Agric. Téc. Méx.* 31:153-163.
- García-Olivares, J. G.; Moreno-Medina, V. R.; Rodríguez-Luna, I. C.; Mendoza-Herrera, A. y Mayek-Pérez, N. 2007. Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento de grano del maíz. *Rev. Fitotéc. Mex.* 30:305-310.
- García-Olivares, J. G.; Moreno-Medina, V. R.; Rodríguez-Luna, I. C.; Mendoza-Herrera, A.; Mayek-Pérez, N. 2008. Efecto de la biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo y maíz en la región semiárida de Tamaulipas, México. In: Díaz-Franco, A. y Mayek-Pérez, N. (eds). La biofertilización como tecnología sostenible. Plaza y Valdés-FOMIX Gobierno del Estado de Tamaulipas. México. 153-166 pp.
- Hernández-Mendoza, J. L.; Quiroz-Velásquez, J. D.; Moreno-Medina, V. R. y Mayek-Pérez, N. 2008. Biosíntesis de ácido antranílico y ácido indolacético a partir de triptófano en una cepa de *Azospirillum brasilense* nativa de Tamaulipas, México. *Rev. Av. Inv. Agrop.* 12:57-67.
- Kamilova, F.; Kravchenko, L. V.; Shaposhnikov, A. I.; Azarova, T.; Makarova, N. and Lugtenberg, B. 2006. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:250-256.
- Layne-Garsaball, J. A.; Méndez, J. R. y Mayz-Figueroa, J. 2007. Efecto de la salinidad del suelo sobre la germinación de semillas de maíz de diferentes pesos en el oriente venezolano. *Temas Agrarios.* 12:62-73.
- Méndez-Natera, J. R.; Merazo-Pinto, J. F. y Montaña-Mata, N. J. 2008. Relación entre la tasa de imbibición y el porcentaje de germinación en semillas de maíz (*Zea mays* L.), caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) y quinchoncho [*Cajanus cajan* (L.) Mill]. *UDO Agrícola.* 8:61-66.
- Mendoza-Elos, M.; Andrio-Enríquez, E.; Juárez-Goiz, J. M.; Mosqueda-Villagómez, C.; Latournerie-Moreno, L.; Castañón-Nájera, G.; López-Benítez, A. y Moreno-Martínez, E. 2006. Contenido de lisina y triptófano en genotipos de maíz de alta calidad proteica y normal. *Universidad y Ciencia.* 22:153-161.
- Román-Palacios, R. 2000. Efecto de iones y otros factores físicos sobre la germinación de semilla. *J. Chem. Soc.* 44:233-236.
- Reddy, M. N.; Ramagopal, G. and Rao, S. 1977. Phenolic acids in groundnut seed exudates. *Plant Soil* 46:655-658.
- Sistema de Información Agropecuaria (SIAP). 2008. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta. SAGARPA. México. URL: http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comanuar.html.
- Vitoria, H. y Méndez-Natera, J. R. 2007. Relación de la calidad fisiológica de semillas de maíz con pH y conductividad eléctrica. *Rev. Fac. Ciencias Agrarias.* 39:91-100.
- Walker, T. S.; Bais, H. P.; Grotewold, T. and Vivanco, J. M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132:44-51.