

## REPERCUSIONES FÍSICAS Y FISIOLÓGICAS DEL ENVEJECIMIENTO NATURAL DE SEMILLAS DE CRUZAS SIMPLES DE MAÍZ Y SUS LÍNEAS PROGENITORAS

## PHYSICAL AND PHYSIOLOGICAL ALTERATIONS CAUSED BY NATURAL AGEING OF MAIZE SEEDS OF SINGLE CROSSES AND THEIR PARENTAL LINES

Elizabeth Madey Fragoso-Pérez<sup>1</sup>, Germán F. Gutiérrez-H.<sup>1\*</sup> y Juan Virgen-Vargas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bioprocesos, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), Instituto Politécnico Nacional. Av. Acueducto s/n, La Laguna Ticomán. 07340, México, D. F. Tel. 01 (55) 5729-6000, ext. 56343.

<sup>2</sup>Programa de Semillas, Campo Experimental Valle de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Apdo. Postal 10. 56230, Chapingo, Edo. de México.

\*Autor para correspondencia (ggutierrez@acei.upibi.ipn.mx)

### RESUMEN

Con la finalidad de detectar y cuantificar los daños causados por el envejecimiento natural sobre algunos eventos iniciales de la germinación, se hizo el análisis físico y fisiológico de semillas de dos edades (19 y 6 años), de dos cruzas simples de maíz y de sus líneas progenitoras. Las semillas estuvieron almacenadas sin control de temperatura ni humedad. Se usó un diseño de bloques al azar con dos repeticiones y 10 semillas como unidad experimental. En cada unidad se evaluó contenido de humedad, integridad del pericarpio, lixiviación de solutos, viabilidad y protrusión radicular. Los resultados indicaron que las variables físicas (contenido de humedad e integridad del pericarpio) permanecieron sin variaciones significativas durante los años de almacenamiento de las semillas; sin embargo, las fisiológicas (protrusión radicular y viabilidad) se afectaron ( $P \leq 0.05$ ) hasta hacerse nulas en semillas de mayor edad, en las cuales también el lixiviado de solutos fue más profuso ( $P \leq 0.05$ ). Se detectaron correlaciones significativas para viabilidad con protrusión radicular (0.98 \*\*) y también con lixiviación de solutos (- 0.66 \*), así como entre lixiviación de solutos y protrusión radicular (- 0.66 \*).

**Palabras clave:** *Zea mays*, germinación, longevidad, envejecimiento natural.

### SUMMARY

In order to detect and to quantify the damage caused by natural ageing of seeds on events involved in the initial stages of maize germination, a physical and physiological analysis of seeds of two ages, 19 and 6 years old, of two single crosses and its inbred parental lines,

were performed. The seeds were stored without control of temperature and humidity. A random block design with two replications of 10 seeds each was used. Variables evaluated were: content of humidity, pericarp integrity, solute lixiviation, seed viability and radicle protrusion. The results indicated that the physical variables (humidity content and pericarp integrity) remained unchanged during the seed storage period; however, the physiological variables (radicle protrusion and viability) were affected ( $P \leq 0.05$ ) by ageing. Solute lixiviation was significantly ( $P \leq 0.05$ ) profuse in 19 years old seeds. Correlations between viability and radicle protrusion (0.98 \*\*), viability and leaching out solutes (- 0.66 \*), as well as between leaching out solutes and radical protrusion (- 0.66 \*), were significant.

**Index words:** *Zea mays*, germination, longevity, natural ageing.

### INTRODUCCIÓN

La disminución paulatina del potencial fisiológico de las semillas de maíz (*Zea mays* L.), ocasionada por el envejecimiento natural, merma progresivamente la capacidad germinativa, la velocidad de crecimiento inicial de la plántula y la tolerancia a condiciones adversas (Marcos-Filho y McDonald, 1998; McDonald, 1999). Tales efectos están asociados con alteraciones bioquímicas evidenciadas durante las primeras horas de imbibición de los tejidos seminales (Cruz *et al.*, 1995), y se expresan primero como reducciones en el desempeño germinativo y en el vigor de las semillas y, posteriormente, al nivel del ADN (Marcos-Filho y McDonald, 1998). El vigor es una característica genética de la planta expresada a nivel de semilla, que es afectada por factores exógenos como la nutrición de la planta madre, daños mecánicos ocasionados durante la cosecha, el procesamiento y el almacenamiento (McDonald, 1998).

Los síntomas de la semilla deteriorada incluyen: pérdida de compuestos solubles por la anómala permeabilidad de las membranas celulares, reducción de la actividad enzimática y producción de sustancias tóxicas como ácidos grasos libres, todo lo cual repercuten en una reactivación deficiente del crecimiento embrionario (Anderson, 1973). La escasa o nula funcionalidad de las membranas seminales es consecuencia de la peroxidación de los lípidos que las constituyen, lo que se traduce en su desorganización y pérdida de actividad metabólica (Wilson y McDonald, 1986). Además, la excesiva permeabilidad provoca pérdida masiva de azúcares, iones inorgánicos y aminoácidos, entre otros componentes celulares, y algunos de ellos podrían quedar en concentraciones inferiores a las óptimas para respiración, actividad enzimática y síntesis de macromoléculas (Bewley y Black, 1994). El envejecimiento o deterioro de las semillas es un fenómeno complejo, que difiere entre genotipos, es influenciado por factores ambientales y biológicos, y no ocurre uniformemente en las semillas de un mismo lote (McDonald, 1999).

El objetivo del presente estudio fue identificar y cuantificar la repercusión del envejecimiento natural sobre los procesos físicos (contenido de humedad y daño mecánico) y fisiológicos (viabilidad, protrusión radicular y lixiviación de solutos) implicados en la germinación de las semillas de dos cruzas simples de maíz, así como en las de sus respectivos progenitores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon semillas de dos cruzas simples de maíz, que son las cruzas hembra de los híbridos dobles, 'H28' y 'H30'; y sus respectivos progenitores, con edades contrastantes, 19 y 6 años de edad, para un total de 12 tratamientos (Cuadro 1). Durante estos años las semillas se almacenaron sin control de temperatura ni humedad, y el material genético fue proporcionado por el Programa de Semillas del Campo Experimental Valle de México, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. El estudio se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del IPN, durante el 2005.

Cuadro 1. Cruzas simples de maíz ('H28' y 'H30') y sus líneas progenitoras, de dos edades y almacenadas bajo ambiente natural.

Tratamiento	Línea	Edad (años)	Genealogía
<b>'H28'</b>			
1	M17	19	Mich21 Comp. 1-7-2
2	M18	19	Mich21 Comp. 1-27-2
3	M17 X M18	19	Cruza simple hembra
4	M17	6	Mich21 Comp. 1-7-2
5	M18	6	Mich21 Comp. 1-27-2
6	M17 X M18	6	Cruza simple hembra
<b>'H30'</b>			
7	M27	19	Mich21-181-14-1
8	M28	19	Mich21-183
9	M27X M28	19	Cruza simple hembra
10	M27	6	Mich21-181-14-1
11	M28	6	Mich21-183
12	M27X M28	6	Cruza simple hembra

## Evaluaciones físicas

**Contenido de humedad.** Inicialmente se registraron los pesos fresco y seco de las semillas; para este último se secaron previamente a 70 °C por 72 h. El contenido de humedad se calculó de acuerdo con la fórmula (López, 1995):

$$H(\%) = \frac{PF - PS}{PF} \times 100$$

donde: H = Contenido de humedad de la semilla (%); PF = Peso fresco de la semilla (g); y PS = Peso seco de la semilla (g).

**Daño mecánico.** Con la prueba del verde rápido (López, 1995) se determinaron los daños mecánicos que las

semillas presentaron en el pericarpio. Para esto, las semillas se sumergieron en 10 mL de la solución del colorante verde rápido (2 %, p/v), a temperatura ambiente por 30 min; luego se lavaron con agua destilada y se secaron superficialmente sobre toallas de papel. Cada semilla se inspeccionó mediante un microscopio estereoscópico y el daño en el pericarpio se manifestó como porciones teñidas intensamente de un verde oscuro.

## Evaluaciones fisiológicas

**Viabilidad.** Se determinó mediante la prueba de tetrazolio (Delouche *et al.*, 1971). Las semillas fueron embebidas en agua destilada por 12 h a temperatura ambiente y luego se disecaron longitudinalmente por el eje embrionario; se eligieron las mitades de las semillas que mostraron mayor definición de sus componentes morfológicos y se mantuvieron sumergidas en agua destilada, para posteriormente colocarlas en cajas petri con el corte hacia abajo y agregarles 10 mL de la solución de cloruro-2-3, 5-trifenil tetrazolio (1 %, p/v).

Las cajas petri permanecieron en incubación por 4 h a 25 ± 2 °C, y enseguida se reemplazó la solución de tetrazolio con agua destilada. La lectura de viabilidad se hizo en las estructuras embrionales, con un microscopio estereoscópico. A cada semilla se le asignó uno de los 16 casos de la clave de interpretación para la prueba de tetrazolio en maíz (Delouche *et al.*, 1971).

**Protrusión radicular.** La aptitud para protruir se evaluó cada 24 h, a partir del inicio de la hidratación de las semillas y hasta 8 d después. Para esta prueba las semillas se incubaron a 25 °C, colocadas sobre papel filtro en cajas petri a las que se adicionaron 10 mL de agua destilada, volumen que se procuró mantener constante. Se consideró que la radícula había protruido de la semilla cuando alcanzó una longitud aproximada de 3 mm (López, 1995).

**Lixiviación de solutos.** Las semillas se limpiaron escrupulosamente en su superficie y se colocaron en tubos de ensayo (13 x 150 mm) que contenían 15 mL de agua destilada. La lixiviación se determinó a 0, 2, 4, 6, 8 y 24 h posteriores a la imbibición, mediante la absorbancia del líquido de imbibición en un espectrofotómetro (Beckman DU-350; California, EE. UU.) a una longitud de onda de 580 nm, la cual se determinó en experimentos previos al presente.

## Análisis estadístico

Los datos se analizaron bajo un diseño completamente al azar, con 12 tratamientos (Cuadro 1), dos repeticiones por tratamiento y con 10 semillas como unidad experimental. La comparación de medias se hizo mediante la prueba

de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Los datos porcentuales se normalizaron mediante la transformación por arcoseno antes de realizar los análisis de varianza y la comparación de medias correspondientes (Reyes, 1980). Además, se calcularon los coeficientes de correlación lineal entre las variables.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectaron diferencias significativas en el análisis de varianza para todas las variables, excepto para daño mecánico (Cuadro 2). El contenido de humedad de las semillas fue similar entre genotipos y entre edades, con valores entre 8.6 y 9.5 %, excepto en el Tratamiento 1 (línea M17 con 19 años de almacenamiento) que tuvo menor cantidad de agua (4.2 %). Esta diferencia se atribuye a alguna situación particular del almacenamiento, puesto que no pudo ser genotípica, porque la misma línea con 6 años de edad (Tratamiento 4) presentó un porcentaje de humedad similar a los demás tratamientos. Es decir, el proceso de envejecimiento no repercutió en esta variable. En la integridad (daño) del pericarpio tampoco hubo efectos estadísticos por la senescencia de las semillas; no obstante, se advierte la tendencia en ambas cruzas simples y edades (Tratamientos 3, 6, 9 y 12), a denotar menor proporción de daños mecá-

nicos, independientemente de su edad (Cuadro 2 y Figura 1), que la línea hembra de cada cruce (Tratamientos 1, 4, 7 y 10).

*Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza de las variables físicas y fisiológicas bajo estudio.*

Variable	Cuadrado medio
Contenido de humedad	8.96 **
Daño mecánico	280.19 ns
Viabilidad	2288.84 **
Protrusión radicular	2595.67 **
Lixiviación de solutos	871.39 **

\* , \*\* = Significativo ( $P \leq 0.05$  y  $0.01$ , respectivamente); ns = No significativo.

El que se haya mantenido constante el contenido de humedad de las semillas y la ausencia de daño mecánico significativo en el pericarpio, a través del prolongado almacenamiento (19 y 6 años) sin control de temperatura ni humedad, evidencia que el manejo postcosecha y almacenamiento fueron óptimos en cuanto a estas variables físicas. Sin embargo, esto no fue suficiente para preservar su aptitud fisiológica, puesto que ocurrió una declinación del potencial germinativo de las semillas a través del envejecimiento, hasta llegar a ser nula tanto la viabilidad como la protrusión radicular en semillas de 19 años de edad (Tratamientos 1, 2, 3, 7, 8 y 9) (Cuadro 3).



*Figura 1. Tinción con solución verde rápido (2 %, p/v). La tonalidad verde oscuro en las zonas dentro de círculos evidencia daño mecánico en el pericarpio (A, M27 con 6 años de edad, Tratamiento 10), mientras que las semillas sin daños exhiben una coloración uniforme (B, M17 x M18 con 19 años de edad, Tratamiento 3).*

Cuadro 3. Comparación de medias de las variables físicas y fisiológicas de las semillas.

Tratamiento	Contenido de humedad (%)	Daño mecánico (%)	Viabilidad (%)	Protrusión radicular (%)	Lixiviación de solutos ( $A \times 10^{-4}$ ) <sup>†</sup>
1	4.2 b	37 a	0 b	0 b	5572 ab
2	8.9 a	30 a	0 b	0 b	4790 ab
3	9.5 a	13 a	0 b	0 b	2125 ab
4	9.5 a	40 a	85 a	81 a	1318 ab
5	9.4 a	9 a	90 a	75 a	843 b
6	9.0 a	12 a	92 a	98 a	919 b
7	9.2 a	19 a	0 b	0 b	4949 ab
8	9.0 a	1 a	0 b	0 b	5881 ab
9	8.6 a	7 a	3 b	0 b	6154 a
10	8.7 a	44 a	81 a	77 a	5572 ab
11	9.5 a	19 a	70 a	90 a	2544 ab
12	8.7 a	22 a	75 a	90 a	3324 ab

<sup>†</sup>Absorbancia del lixiviado a las 6 h de imbibición.

Medias con la misma letra, en cada columna, son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

La lixiviación de solutos de las semillas se estabilizó a partir de las 6 h de imbibición en todos los Tratamientos (Figura 2), pero con diferencias significativas entre genotipos (Cuadro 4). Por ello se eligió este lapso de hidratación de las semillas para efectuar la comparación estadística de la pérdida de solutos celulares (Cuadro 3), la cual se estimó mediante los valores de absorbancia en los lixiviados presentes en el agua de imbibición de las semillas. Las semillas de mayor edad (19 años) lixivieron significativamente mayor cantidad de metabolitos que las más jóvenes (6 años); la mayor lixiviación ocurrió en la crusa simple M27 x M28 con 19 años, y la menor en la línea M18 con 6 años de edad (Tratamientos 9 y 5, respectivamente).

Cuadro 4. Cuadrados medios del análisis de varianza de los datos de lixiviación de solutos, y promedios respectivos, para los tratamientos bajo estudio en cada tiempo de imbibición.

Imbibición (h)	Cuadrados medios	Promedios
		Absorbancia ( $A \times 10^{-4}$ ) <sup>†</sup>
2	0.55 **	120.7 b
4	0.41 **	133.5 b
6	765.7 **	3477.3 a
8	763.88 **	3514.7 a
24	763.77 **	3533.1 a

\* y \*\* = Significativo ( $P \leq 0.05$  y 0.01, respectivamente);<sup>†</sup>Absorbancia del lixiviado (580 nm); Medias con la misma letra, en cada columna, son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

La salida de metabolitos celulares tendió a ser menor o intermedia en las cruzas simples, en comparación con sus líneas progenitoras, pero sin alcanzar diferencias significativas. El comportamiento de estos genotipos en lixiviación de solutos coincide con el que exhibieron para daño mecánico y podrían ser manifestaciones heteróticas de escasa magnitud, debido a que las cruzas simples poseen una base genética similar, así como un reducido nivel de endogamia en sus líneas progenitoras (Cuadro 1), circunstancia que habría que corroborar con mayor tamaño de muestra y más repeticiones.

Los procesos fisiológicos de viabilidad y protrusión radicular (Cuadro 3) fueron nulos en las semillas de mayor edad, comportamiento acorde con lo reportado por varios autores (Cruz *et al.*, 1995; Pérez y Martínez, 2004), quienes aducen que el avance de la edad induce alteraciones progresivas e irremisibles en diferentes niveles metabólicos (bioquímico, fisiológico y molecular), las cuales menoscaban la capacidad fisiológica de las semillas para germinar, e incluso eliminan todo signo de actividad metabólica (viabilidad).

En la prueba de tinción con tetrazolio se detectaron zonas sin actividad metabólica distribuidas al azar en las estructuras del embrión, aunque en las semillas de 19 años de edad fue predominantemente en el meristemo radicular (Figura 3), donde no se produjo el formazán, compuesto rojo insoluble que se produce al reducirse la solución de tetrazolio con los electrones del proceso respiratorio de las células activas al inicio de su hidratación (Moore y Goodsell, 1965). La carencia de actividad respiratoria en la región radicular ha sido ya documentada en semillas envejecidas de manera natural (Cruz *et al.*, 2003) y esto explicaría el alto grado de correlación ( $r = 0.98 **$ ) entre viabilidad y protrusión radicular en el análisis de correlación (Cuadro 5).

Tal comportamiento en lixiviación de solutos de las semillas, permite proponer a la disminución o pérdida de funcionalidad de la membrana celular, como un signo de senescencia de semillas, mecanismo ya reportado por Wilson y McDonald (1986). Esta posibilidad se respalda con los valores de correlación (Cuadro 5), en los cuales la lixiviación de solutos celulares se asoció inversa y significativamente con viabilidad ( $r = -0.66 *$ ) y con protrusión radicular ( $r = -0.66 *$ ).

Fisiológicamente estas manifestaciones podrían interpretarse como una secuencia de eventos de deterioro que comienza con problemas de funcionalidad en las membranas seminales, lo que ocasiona un flujo excesivo de

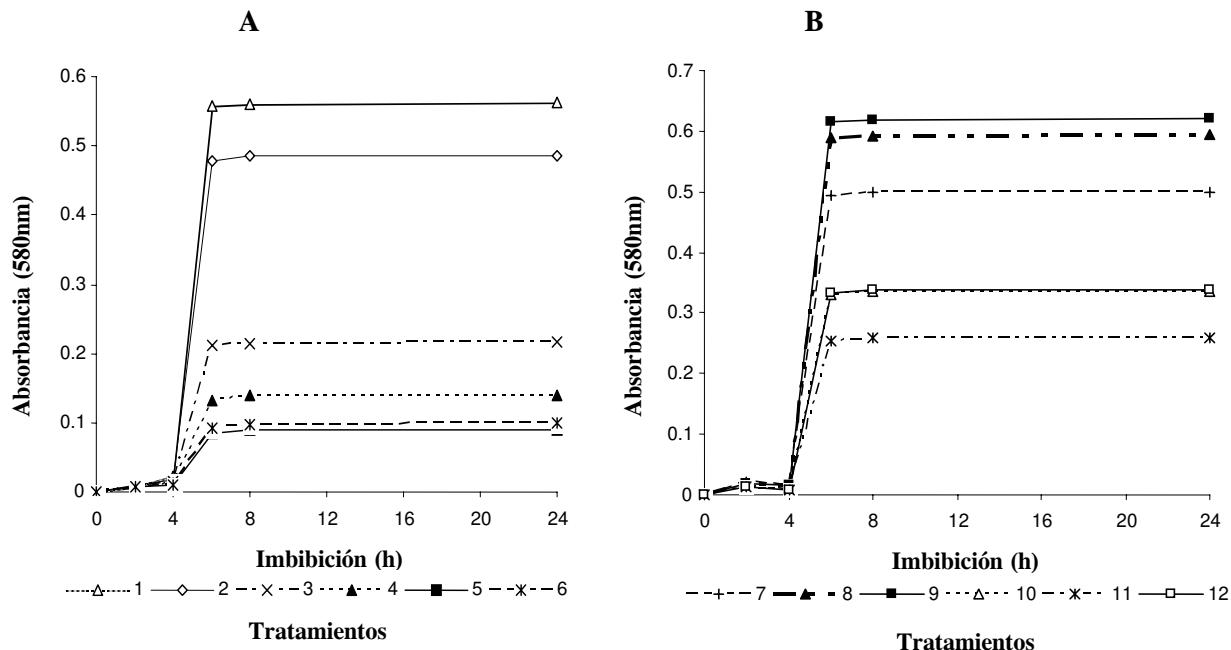


Figura 2. Cinética de lixiviación de solutos de las semillas de los híbridos 'H28' (A) y 'H30' (B), y de sus respectivos progenitores. Tratamientos: 1 = M17, 19 años; 2 = M18, 19 años; 3 = M17 x M18, 19 años; 4 = M17, 6 años; 5 = M18, 6 años; 6 = M17 x M18, 6 años; 7 = M27, 19 años; 8 = M28, 19 años; 9 = M27 x M28, 19 años; 10 = M27, 6 años; 11 = M28, 6 años; 12 = M27 x M28, 6 años.

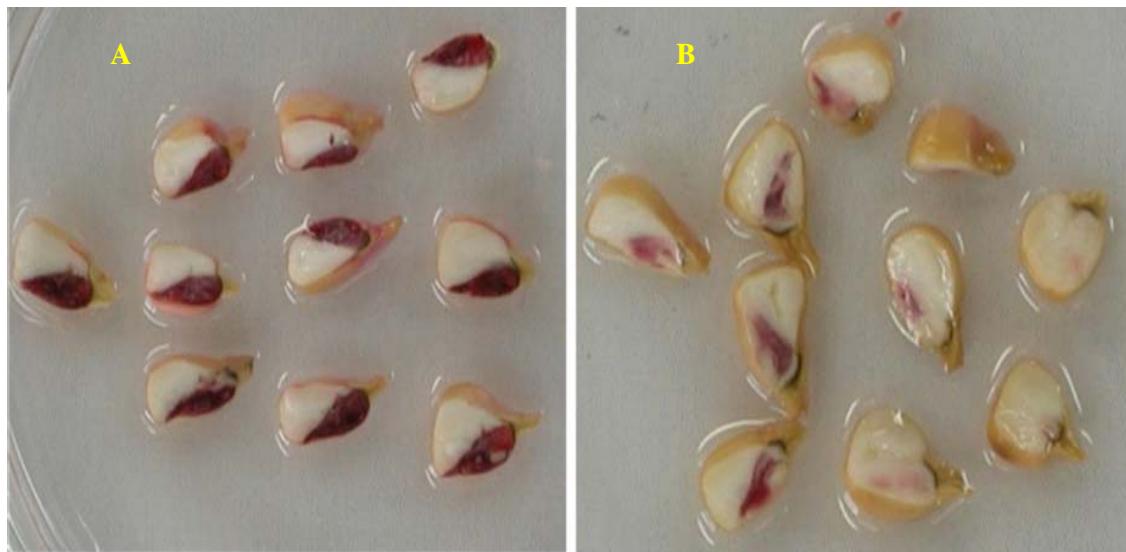


Figura 3. Prueba de viabilidad con tetrazolio (1 %, p/v). El color rojo intenso del embrión denota alta viabilidad de la semilla (A, M17 con 6 años de edad, Tratamiento 4), mientras que la ausencia de color indica escasa o nula actividad metabólica, particularmente esto se observa en la zona de la radícula (B, M17 con 19 años de edad, Tratamiento 1).

*Cuadro 5. Coeficientes de correlación lineal entre las variables físicas y fisiológicas del estudio.*

	Contenido de humedad	Daño Mecánico	Viabilidad	Protrusión radicular
Daño mecánico	- 0.33 ns			
Viabilidad	0.33 ns	0.23 ns		
Protrusión radicular	0.32 ns	0.24 ns	0.98 **	
Lixiviación de solutos	- 0.41 ns	0.02 ns	- 0.66 *	- 0.66 *

\*, \*\* = Significativo ( $P \leq 0.05$  y  $0.01$ , respectivamente); ns = No significativo.

constituyentes celulares, evidenciado éste por los altos valores de absorbancia y la consecuente pérdida de metabolitos, cuya magnitud puede restringir al proceso germinativo (Bewley y Black, 1994).

## CONCLUSIONES

El envejecimiento de las semillas de las cruzas simples, así como de sus líneas progenitoras, no repercutió en su contenido de humedad ni sobre la integridad del pericarpio, pero sí menoscabó su potencial metabólico en cuanto a viabilidad y protrusión radicular. La lixiviación de solutos de las semillas de 19 años de edad fue significativamente más cuantiosa que en semillas de 6 años, por lo que se le consideró como signo de deterioro. Hubo correlaciones significativas de viabilidad con protrusión radicular ( $0.98 **$ ) y con lixiviación de solutos ( $r = - 0.66 *$ ), así como entre lixiviación de solutos y protrusión radicular ( $r = - 0.66 *$ ).

## AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN (SIP:20050657) y a la Comisión de Operación y Fomento

de Actividades Académicas del IPN (Becas de Exclusividad y PIFI), por el financiamiento; al INIFAP por dar acceso a su valioso germoplasma, y al Laboratorio de Biotecnología de la UPIBI por las facilidades otorgadas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anderson J D (1973)** Metabolic changes associated with senescence. *Seed Sci. Technol.* 1:401-406.
- Bewley J D, A M Black (1994)** Seeds: Physiology of Development and Germination. 2nd Plenum Press. N. Y. USA. 445 p.
- Cruz G F, V A González-H, J Molina-M, J M Vázquez-R (1995)** Seed deterioration and respiration as related to DNA metabolism in germinating maize. *Seed Sci. Technol.* 23:477-486.
- Cruz P A B, V A González-H, M Mendoza-C, M L Ortega-D (2003)** Marcadores fisiológicos de la tolerancia al envejecimiento de semilla en maíz. *Agrociencia* 37:371-381.
- Delouche J C, T Wayne S, M Raspet, M Lienhard (1971)** Prueba de viabilidad de semillas con tetrazol. CRAT, AID. Buenos Aires, Argentina. 256 p.
- López H A (1995)** Manual de Prácticas de Laboratorio de Producción y Tecnología de Semillas. Fitotecnia, UACH. Chapingo, México. 29 p.
- Marcos-Filho J, M B McDonald (1998)** Sensitivity of RAPD analysis, germination and vigour test to detect the intensity of deterioration of naturally and artificially aged soybean seeds. *Seed Sci. Technol.* 26:141-157.
- McDonald M B (1998)** Seed quality assessment. *Seed Sci. Technol.* 8:265-275.
- McDonald M B (1999)** Seed deterioration: physiology, repair, and assessment. *Seed Sci. Technol.* 27:177-237.
- Moore R P, S F Goodsell (1965)** Tetrazolium test for predicting cold test performance of seed corn. *Agron. J.* 57:489-491.
- Pérez F G, J B Martínez (1994)** Introducción a la Fisiología Vegetal. Mundi-Prensa. México. 250 p.
- Reyes C P (1980)** Bioestadística Aplicada: Agronomía, Biología, Química. Ed. Trillas, México, D. F. 213 p.
- Wilson D O, M B McDonald (1986)** The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Sci. Technol.* 27:177-237.