

577.154.31: 631.531.1: 633.15

Acción de la N(2-4 Diclorofenil) Glicinhidrácida y de la O(2-4 Diclorofenil) Acetilhidrácida sobre la actividad amilásica de semillas de maíz en germinación

POR

CEFERINA R. ORDÓÑEZ (*), MARÍA H. C. K. DE RIVERÓS (**)
EUGENIO E. VONESCH (***)

El efecto fitotóxico de la N(2-4 diclorofenil) glicinhidrácida (I) y de la O(2-4 diclorofenil) acetilhidrácida (II), estudiado en la germinación y el desarrollo de semillas de maíz, tomate y trigo, con producción de lesiones histotóxicas de tipo citoplasmático, motivó el examen de algunos aspectos enzimáticos relacionados con la acción de estos compuestos (¹⁰). Los mismos (¹¹) observaron además, que en las semillas tratadas, el almidón del cotiledón adquiría un aspecto viscoso y un aparente retardo en su utilización como material de reserva. Al estudiar la actividad amilolítica de semillas tratadas con dichos compuestos, se verificó la producción de glúcidos solubles, juntamente con los aminoácidos, por depender de aquel proceso enzimático.

La separación e identificación de las amilasas que actúan en las primeras etapas de la germinación de las semillas amiláceas es dificultosa, razón por la cual no se intentó fraccionarlas. Procediéndose de acuerdo con Whelan (¹²), apreciando el conjunto amilásico alfa-beta y el de las amilasas Q-R, por ajustes de la reacción del medio, a los valores de pH óptimos, de 5 y 7 respectivamente. La actividad amilolítica de las semillas fue estimada por valoración de los glúcidos reductores producidos sucesivamente y en un lapso de 20 días; identificando los glúcidos solubles y los aminoácidos producidos simultáneamente por cromatografía sobre papel. También se observó la in-

(*) Profesora Adjunta de Química Biológica.

(**) Investigadora contratada.

(***) Profesor Titular de Química Biológica.

fluencia de la luz en los procesos germinativos de las semillas tratadas.

En este estudio se intentó relacionar el efecto aparentemente fitotóxico de estos compuestos con la actividad amilásica; el cual se manifiesta por una acción retardante en el desarrollo de las plántulas de las semillas tratadas con respecto de las testigos.

PARTE EXPERIMENTAL

Material botánico

Semillas de maíz: *Zea Mays-L*, híbrido Funk G.203, cosecha 1962.

Compuestos ensayados

Se emplearon las siguientes hidrácidas: la N(2-4 diclorofenil) glicinhidrácida de P.F. 116-118° C, y la O(2-4 diclorofenil) acetilhidrácida de P.F. 155-157° C (8) en solución acuosa conteniendo 0,2 g %.

Tratamiento y germinación

Las semillas se someten antes de su germinación a un tratamiento con las soluciones de la sustancia activa. Consiste en mantenerlas por 24 hs. en remojo con las soluciones de I y II, y a continuación disponerlas en un germinador sistema "Koenig", donde se las mantiene mientras dura la experiencia. Las semillas no reciben ningún agregado de nutrientes durante su desarrollo y solamente se repone el agua perdida por evaporación.

Los ensayos se realizaron bajo la acción de la luz difusa y en completa oscuridad; en este último caso con el germinador tapado.

Simultáneamente con los ensayos se llevaron los correspondientes testigos.

Determinación de la actividad amilásica

Se siguió la técnica de Myers y col. (4), por formación del ácido picrámico, y adaptada para este material. La reacción cromática resultante fue aplicada para su determinación fotocolorimétrica al espectrofotómetro Jobin Ivon, Maroc II, ajustado a 5180 Å.

Soluciones reguladoras de pH 5 y 7

Se utilizó la solución de acetato de sodio/ácido acético para la pri-

mera, y para la segunda la de fosfato disódico/fosfato monopotásico de Sörensen.

Técnica

Se pesan tres o cuatro semillas, que se trituran en un mortero y se malaxan con 10 ml de agua destilada; filtrando el líquido por algodón laxo. En el tubo N° 1 o problema se colocan: 1 ml del extractivo filtrado, 3 ml de solución reguladora de pH = 5,0 (o pH = 7,0) y 1 ml de solución de cloruro de sodio 0,1 M. Se incubaba el tubo en baño maría a 40° C durante 15 minutos.

En el tubo N° 2 o blanco se disponen: 3 ml de solución reguladora, 1 ml de solución de cloruro de sodio 0,1 M y se lo incubaba junto con el problema a la misma temperatura y por el mismo tiempo.

Transcurrido ese lapso se quitan del baño y se los enfría.

Al tubo N° 1 se le agrega 0,50 g de ácido pícrico sólido y se filtra; al tubo N° 2 se le agrega: 1 ml del extractivo y 0,50 g de ácido pícrico sólido, y se filtra.

En sendos tubos se colocan 1 ml del filtrado del tubo N° 1 y 1 ml del filtrado del tubo N° 2, se les agrega 1 ml de solución saturada de carbonato de sodio. Se disponen en baño maría hirviente durante 20 minutos. Luego se los enfría en baño de agua. Se trasvasa cuantitativamente el líquido a matraces aforados de 100 ml, que se completan a volumen con agua destilada.

El objeto del blanco para cada ensayo, es al efecto de la corrección de los glúcidos solubles ya presentes y que no derivan de la acción amilásica.

Los datos obtenidos de las lecturas fotocolorimétricas y calculados en base a la curva de calibración establecida previamente, dan el contenido en glúcidos reductores.

La actividad amilásica se valoró al 5°, 8°, 12°, 15° y 19° días, contados desde la iniciación del tratamiento. Los ensayos estuvieron limitados a 19-20 días, por ser el lapso máximo que permitió mantener las plántulas libres de hongos. Se evitó el agregado de sustancias mico y bacteriostáticas para no influir sobre la acción enzimática.

Identificación cromatográfica de los glúcidos solubles

Se aplicó la técnica de Partridge (6). El extractivo se preparó triturando en mortero tres semillas de peso total 500-600 miligramos y extrayendo los glúcidos solubles con 3 ml de agua destilada. Cada

cromatograma se sembró con 0,12 μ l; para cada tratamiento por separado y en las distintas fechas. Se usó papel S&S 2043 bm; fase móvil piridina, n-butanol, agua (40:60:30).

Identificación cromatográfica de aminoácidos

Se aplicó la técnica de Partridge (⁷). La correspondiente extracción se efectuó también sobre tres semillas de peso similar, con la mezcla de etanol-agua (2:1). Las siembras se realizaron en cada caso con 0,12 μ l.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la actividad amilásica de las semillas germinadas en la oscuridad y en la luz se resumen en los correspondientes gráficos (1-4) y cuadros (I y II).

Los cromatogramas de los glúcidos permitieron identificar a los siguientes azúcares: glucosa, fructosa, galactosa, maltosa y una diotriosa no individualizada con un $R_f = 0,24$ (⁵). De ellos, la maltosa aparece recién al 8º día. La glucosa desaparece al 8º día, para reaparecer nuevamente hacia el 15º día. La sacarosa estaba siempre presente a partir del 5º día (⁹).

Los aminoácidos identificados al 8º y 15º día fueron los siguientes: alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, cistina, isoleucina, fenilalanina, hidroxiprolina, lisina, prolina, serina, tirosina, triptófano y valina. En lo que se refiere a los glúcidos y aminoácidos identificados no se observaron mayores diferencias entre las tratadas y las testigos, germinadas a la luz o en la oscuridad.

Al relacionar las actividades amilásicas con las tallas de las plántulas, se observó un mayor tamaño de las raíces y coleótilos en las testigos que en las tratadas, durante toda la experiencia; en tanto que la actividad amilásica es mayor en las tratadas (con I y II) que en las semillas control (cuadro IV).

DISCUSIÓN

El conjunto de los datos obtenidos permitió establecer que las semillas tratadas y desarrolladas a la luz difusa presentan un máximo de actividad amilásica alfa-beta entre el 8º y el 12º día, lo que estaría de acuerdo con los resultados de Dure (²), que halló dicha actividad máxima al 10º día pero sin tratamiento alguno. En los ensayos realizados

se observa que al 19º día, en las tratadas la actividad alfa-beta amilásica mantiene valores similares a los del 15º día, en tanto que en los controles su acción se ha anulado.

Con respecto a las amilasas Q y R existen discrepancias acerca de su identidad. Hobson aisló la enzima R⁽³⁾. Whelan sostiene la identidad de Q y R ya que la enzima R actúa modificando la ubicación de las hélices de amilopectina y favorecería la acción de la beta-amilasa, permitiendo la formación de maltosa y maltoriosa, a partir de la amilopectina. En cambio la enzima Q sería una transglucosidasa⁽³⁻¹²⁾.

Ambas poseen un pH óptimo de acción de alrededor de pH 7. La actividad máxima de estas enzimas, tanto en las semillas tratadas como en las no tratadas ocurre al 8º día, pero estas últimas dan valores mayores (cuadro II).

El tratamiento con I y II para las semillas germinadas a la luz difusa se manifestaría por un retardo en la acción de las amilasas Q-R. En los ensayos mantenidos en la oscuridad se comprueba una actividad mayor de todo el conjunto amilásico de las tratadas, respecto a las no tratadas.

CONCLUSIONES

De los ensayos efectuados sobre la actividad amilásica de la N(2-4 diclorofenil) glicinhidrácida y de la O(2-4 diclorofenil) acetilhidrácida sobre el conjunto amilásico de semillas de maíz en los primeros 19º días de su desarrollo se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1º) Las dos hidrácidas ensayadas exaltan en distinto grado, tanto a la luz como en la oscuridad la actividad amilásica, que presenta un máximo hacia el 8º día.

2º) El incremento de actividad del conjunto amilásico producido, es mayor para las enzimas del grupo alfa-beta que para el grupo de las Q-R.

3º) Los glúcidos solubles y los aminoácidos producidos durante el período de la germinación bajo la acción de ambas hidrácidas, no ofrece diferencias significativas.

4º) Se observó un menor desarrollo y talla en las plántulas tratadas respecto a las testigos.

CUADRO N° I
 ACTIVIDAD AMILASICA

Semillas germinadas en la oscuridad

Glúcidos reductores: mg/g de semillas fresca.

Días	Amilasas alfa-beta			Amilasa Q-R		
	T	I	II	T	I	II
5	15	10,6	19,7	4,2	22,1	9,3
8	5,5	17	15	8	15,5	8,3
12	5,3	10	20	7	10	10
15	6,8	7,5	12,5	2,5	5,5	2,5

Promedio de tres ensayos.

CUADRO N° II
 ACTIVIDAD AMILASICA

Semillas germinadas en la luz

Glúcidos reductores: mg/g de semilla fresca.

Días	Amilasa alfa - beta			Amilasa Q - R		
	T	I	II	T	I	II
5	6,8	37,1	11,7			
8	16,8	37,1	15	51	19	48
12	13	30,4	20	6,5	11,7	9,3
15	7,6	16,2	14,6	11	8	5
19	0	16,7	18,7	0	9,6	5,1

Promedio de tres ensayos.

CUADRO N° III
GLUCIDOS IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFIA

D í a s	Germinadas en la luz			Germinadas en la oscuridad				
		5	8	15	3	6	8	15
Glucosa	T	+	-	+	+	+	+	+
	I	+	-	+	+	+	+	+
	II	+	-	+	+	+	+	+
Fructosa	T	+	+	+	+	+	+	+
	I	+	+	-	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	T	+	+	+	+	+	+	+
	I	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	T	+	+	-	-	-	+	-
	I	+	+	-	-	-	+	-
	II	+	+	-	-	-	+	-
Maltosa	T	-	+	-	-	-	+	-
	I	-	+	-	-	-	+	-
	II	-	+	-	-	-	+	-
Desconocido f = 0,24	T	-	-	-	-	-	+	-
	I	-	-	-	+	-	+	-
	II	-	-	-	+	-	+	-

CUADRO N° IV
TALLAS PROMEDIOS DE LAS PLANTULAS

Tratadas:	Germinadas en la oscuridad al 8° día		Germinadas en la luz al 15° día
	Raíces	Coleoptilo	Coleoptilo
	mm.	mm.	mm.
I	12	9,5	18
II	7	8,5	11
Testigo	42	25	23

RESUMEN

Se estudió la acción de la N(2-4 diclorofenil) glicinhidrácida y de la O(2-4 diclorofenil) acetilhidrácida sobre el conjunto amilásico de las semillas de maíz en germinación, relacionando el proceso de la amilólisis con los glúcidos solubilizados y los aminoácidos producidos. Se comprobó un incremento marcado en la actividad alfa-beta para las semillas tratadas, que se manifiesta tanto en las semillas germinadas en la luz como en la oscuridad.

Los glúcidos solubles y los aminoácidos producidos simultáneamente, no señalan diferencias cualitativas. Las tallas de coleóptilos y raíces de las semillas tratadas son menores que las correspondientes no tratadas.

SUMMARY

The action of N(2-4 dichlorophenil) glycinhydrazide and O(2-4 dichlorophenil acetylhydrazide on the germination process of corn seeds has been studied.

The amilolitic activity was related with the soluble sugars and aminoacids produced at light and dark of the treated seeds, an increase in the alpha-beta amyloitic activity on the treated seeds was noted.

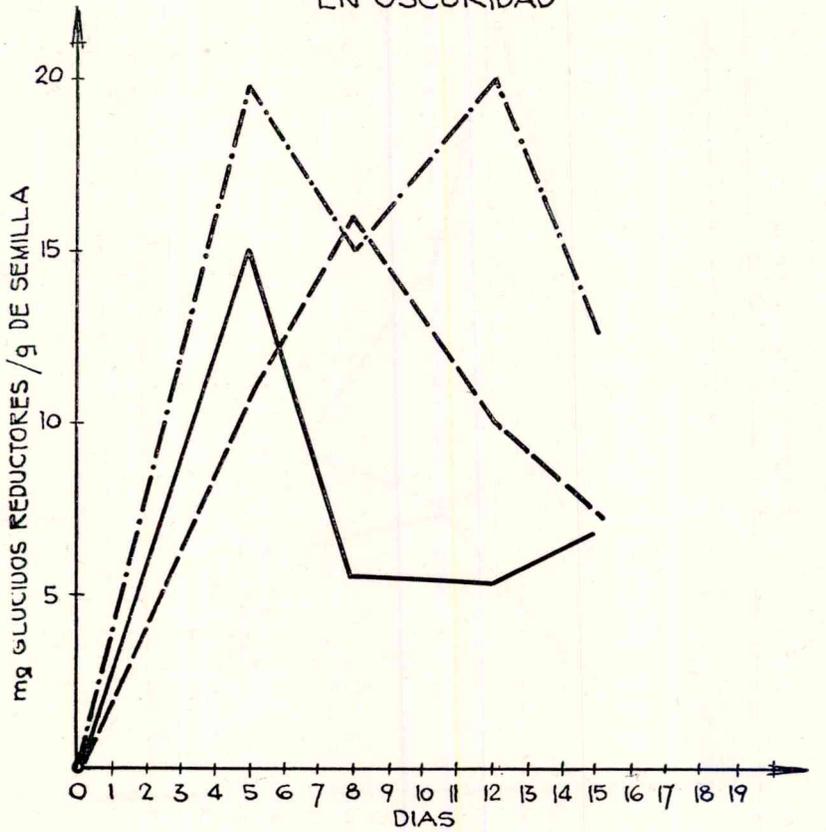
Roots and coleoptils of the untreated plants were longer than the treated ones.

BIBLIOGRAFIA

1. BUNGI, M., *Nature*, **167**, 606 (1951).
2. DURE, L. S., *Plant Physiol.*, **35**, 925 (1960).
3. HOBSON, P. N., *Biochem. J.*, **47**, XXXIV (1950).
4. MYERS, V. C., FREE, A. H., ROSNISKI, E., *J. Biol. Chem.*, **154**, 89 (1944).
5. PANZUR, J. H., SANDSTED, R. M., *Cereal Chem.*, **31**, 416 (1954).
6. PARTRIDGE, S. M., *Nature*, **158**, 270 (1946).
7. PARTRIDGE, S. M., *Biochem. J.*, **35**, 925 (1948).
8. PASSERON, S., BRIEUX, J. A., *Bull. Soc. Chim. France*, pág. 35 (1963).
9. PORTER, H. J., J., *Exper. Bot.*, **6**, 43 (1955).
10. RIVERÓS, M. H. C. K. DE; VONESCH, E. E. Y BRIEUX, J. A., *Acción de las hidrácidas de N(mono y diclorofenil)glicinas y compuestos relacionados sobre la germinación de semillas de maíz, trigo y tomate*. Comunicación presentada al Congreso Panamericano de Química, Bs. As. (1962).
11. Ibid. *ibid. Comunicación personal*.
12. WHELAN, W. J., *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. VI, editado por W. RUHLAND, SPRINGER VERLAG (1958).

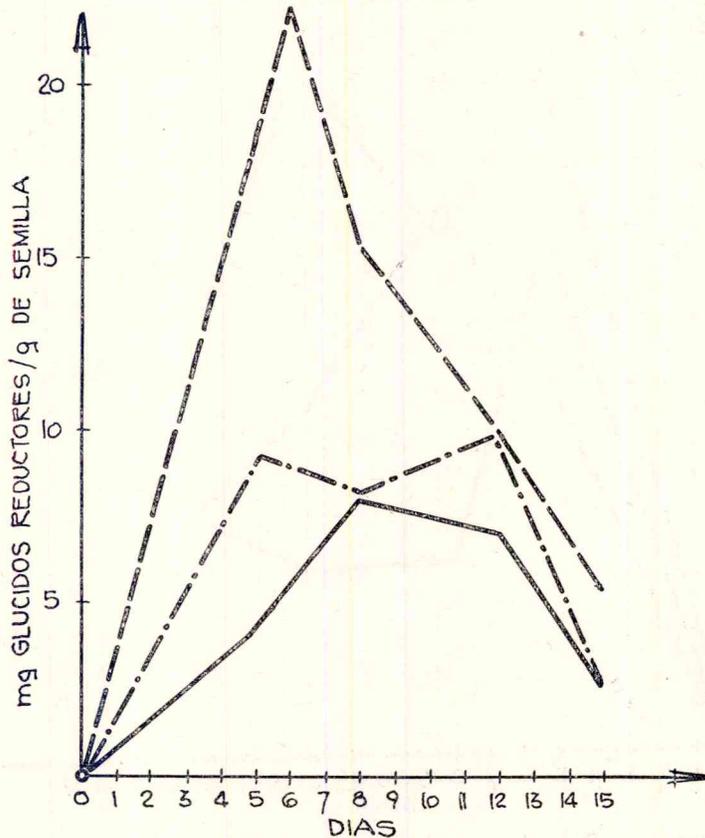
Agradecimientos. Al Profesor Dr. Jorge A. Brioux por las hidrácidas y al Ingeniero Agrónomo Hernán Felgueras por las semillas de maíz facilitadas.

GRAFICO Nº 1
ACTIVIDAD AMILASICA α - β
 EN OSCURIDAD



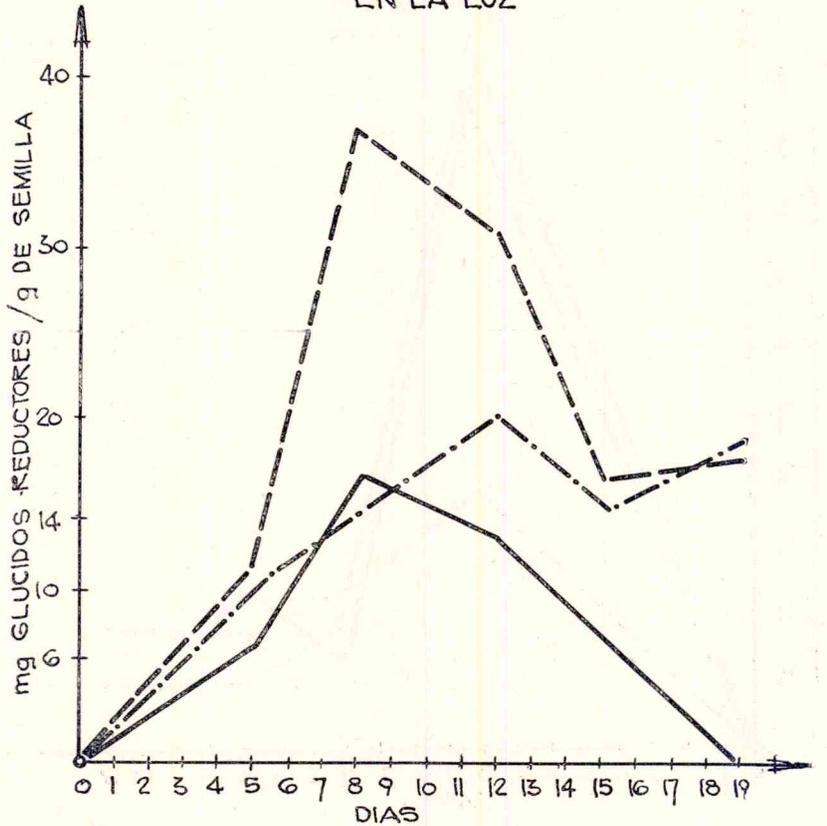
Legenda: — Tratadas con I: - - - - - Tratada con II: - · - · - ·

GRAFICO N° 2 ACTIVIDAD AMILASICA Q-R EN OSCURIDAD



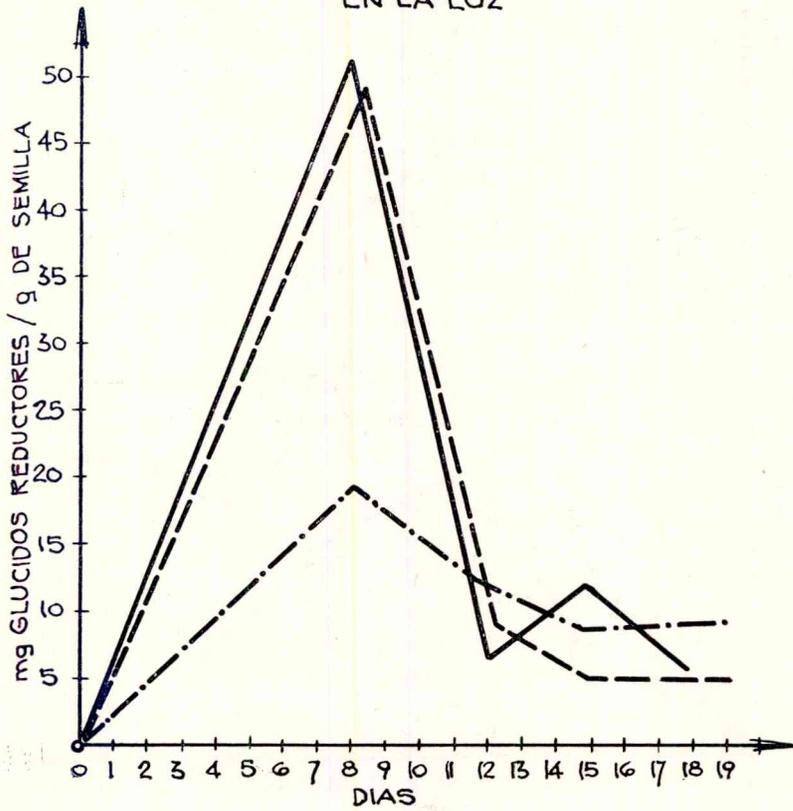
Testigo: ——— Tratadas con I: - - - - Tratadas con II: - . - . -

GRAFICO N°3
 ACTIVIDAD AMILASICA α - β
 EN LA LUZ



Testigo: ——— Tratadas con I: - - - - - Tratadas con II: - . - . -

GRAFICO Nº4
ACTIVIDAD AMILASICA Q-R
EN LA LUZ



Testigo: ——— Tratadas con I: - - - - - Tratadas con II: - · - · -