

Evaluación de la actividad malato deshidrogenasa en semillas deterioradas de girasol*

M. de Paula, M. Darder, M. Torres^{1**} y C. J. Martínez-Honduvilla

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II y
¹Departamento de Biología Vegetal II
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense
28040 Madrid (España)

(Recibido el 10 de mayo de 1993)

M. DE PAULA, M. DARDER, M. TORRES and C. J. MARTÍNEZ-HONDUVILLA. *Evaluation of Malate Dehydrogenase Activity in Deteriorated Sunflower Seeds*. Rev. esp. Fisiol., 49 (4), 225-230, 1993.

Malate dehydrogenase (MDH) activity in sunflower (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) seeds stored at 65 °C and 90 °C for 1, 3, 5, 7, and 14 days was evaluated. This study was design to discern the usefulness of this viability test for deteriorated seeds. Differences in the resistance to the heat storage were detected between treatments as reflected by changes in the evolution of MDH activity. A decrease of MDH activity in both soluble and mitochondrial fractions was observed, which was more evident in seeds stored at high temperature. These differences are poorly correlated to viability as determined by tetrazolium staining, and should be related to integrity of cellular membranes as evidenced by differential MDH activity in soluble and mitochondrial fractions.

Key words: Malate dehydrogenase, Deterioration, Seeds, Sunflower.

Las características de las semillas son dependientes de la integridad de las macromoléculas presentes en sus células y de su organización compartimental, pero en las semillas almacenadas en estado seco, la degradación de estructuras y elementos

funcionales se produce progresiva e irreversiblemente como resultado de diversas reacciones o procesos, entre los que se encuentran los que provocan cambios en ciertas actividades enzimáticas (10, 17, 19). La evaluación de estos cambios como método para predecir y/o estimar la viabilidad y vigor de semillas se ha utilizado con poca frecuencia debido fundamentalmente a sus propios condicionantes, mayor tiempo de ejecución, coste y especialización. La mayoría de las veces se han realizado deter-

* Trabajo financiado por la Universidad Complutense de Madrid (Proyecto MD/08/89-1472).

** A quien debe dirigirse toda la correspondencia (Tel.: 91-394 18 05. Fax: 91-394 17 72).

minaciones indirectas mediante el empleo de distintos colorantes, como el cloruro de trifeniltetrazolium (TTC), sobre todo, en relación con las posibles alteraciones que el almacenamiento pueda ocasionar en las mitocondrias (3, 11, 12). No obstante, la evaluación de los cambios enzimáticos, como sistema indicador de la viabilidad y vigor de semillas constituye uno de los procedimientos más exactos y rigurosos para el análisis de la calidad y/o bondad de semillas y proporciona, además, una mayor información sobre las posibles causas del deterioro y/o envejecimiento de semillas. Considerando que este tipo de ensayos bioquímicos constituyen una alternativa eficaz para una valoración rigurosa de la calidad y estado fisiológico de las semillas, en este trabajo se presenta la evaluación de la actividad malato deshidrogenasa (E. C. 1.1.1.37) como sistema estimador de la viabilidad y vigor de semillas de girasol deterioradas por almacenamiento a altas temperaturas.

Material y Métodos

Semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) de bajo peso (≤ 70 g/1000 semillas) fueron almacenadas durante un período de 1, 3, 5, 7 y 14 días, a 65 °C y 90 °C. El efecto de las condiciones de almacenamiento en la viabilidad y vigor de las semillas se analizó por determinación directa de la actividad malato deshidrogenasa (MDH) y por determinación indirecta de la actividad MDH mediante ensayo de coloración con cloruro de 2, 3, 5 trifeniltetrazolium (TTC) y su relación con la capacidad germinativa, de acuerdo con las normas internacionales (12).

La extracción de la enzima se realizó por homogeneización en frío con tampón fosfato (0,12 M, pH 7,2, 6 ml/g semilla) y posterior centrifugación diferencial para obtener las fracciones mitocondrial y soluble. La reacción enzimática llevada a cabo por la enzima es reversible, aunque

está fuertemente favorecida por la formación de L-malato a partir de oxalacetato. La cantidad de ácido oxalacético que reacciona por unidad de tiempo, medida por el descenso de absorbancia a 339 nm por oxidación del NADH, es una medida de la actividad catalítica de la enzima (4).

Los datos obtenidos en los distintos ensayos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando un modelo de diseño jerárquico. Los porcentajes de germinación fueron previamente normalizados mediante la transformación angular de Bliss [$y = \arcsen(\bar{x}/100)^{1/2}$] y, siempre que fue necesaria la comparación de medias, la menor diferencia significativa se calculó por el test múltiple de Duncan para el nivel de significación encontrado en el correspondiente ANOVA.

Resultados

La actividad MDH presente en la fracción soluble procedente de semillas almacenadas a 65 °C y 90 °C durante períodos comprendidos entre 1 y 14 días se muestra en la figura 1. La actividad MDH varía de distinta manera según el tiempo de tratamiento. En las semillas almacenadas a 65 °C disminuye gradualmente a medida que se prolonga el período de almacenamiento, mientras que en las semillas sometidas a 90 °C el descenso es más acusado y evidente durante los primeros días de almacenamiento. El análisis de la varianza denota diferencias estadísticamente significativas para la MDH soluble en ambos tratamientos; la aplicación del test múltiple de Duncan revela que las semillas almacenadas durante 3 y 5 días a 65 °C presentan una actividad MDH semejante ($P \geq 0,05$) y que el almacenamiento durante 5, 7 y 14 días a altas temperaturas (90 °C) tiene un efecto similar en las semillas de girasol, ya que no se detectan diferencias estadísticamente significativas ($P \geq 0,001$) entre las semillas sometidas a este tipo de tratamien-

to. Un resultado semejante se observa en la actividad MDH en la fracción mitocondrial (figura 1), aunque conviene resaltar que si bien se aprecia una disminución, ésta muestra una evolución diferente a la descrita para la fracción soluble (fig. 1). En las semillas tratadas a 65 °C, el descenso de la actividad MDH mitocondrial es menos pronunciado y sostenido, siendo más acusado a medida que se prolonga el tiempo de almacenamiento, aunque la separación de medias por el test múltiple de Duncan no refleja diferencias entre las semillas almacenadas durante 1, 3 y 5 días.

Los resultados obtenidos en los ensayos

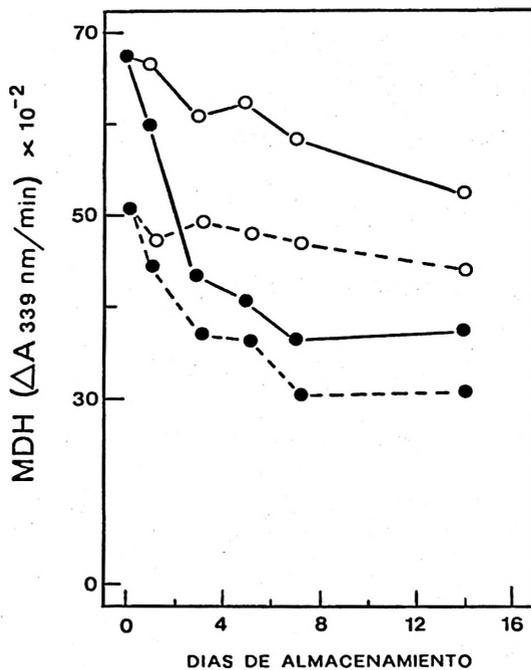


Fig. 1. Evaluación de la viabilidad de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. *Peredovik*) almacenadas a 65 °C (○) y 90 °C (●) mediante la determinación de la actividad malato deshidrogenasa (MDH) presente en las fracciones soluble (—) y mitocondrial (- - -).

Cada punto representa el valor medio de 4 ensayos independientes, cada uno con 5 repeticiones. Los errores estándar no exceden del tamaño del símbolo.

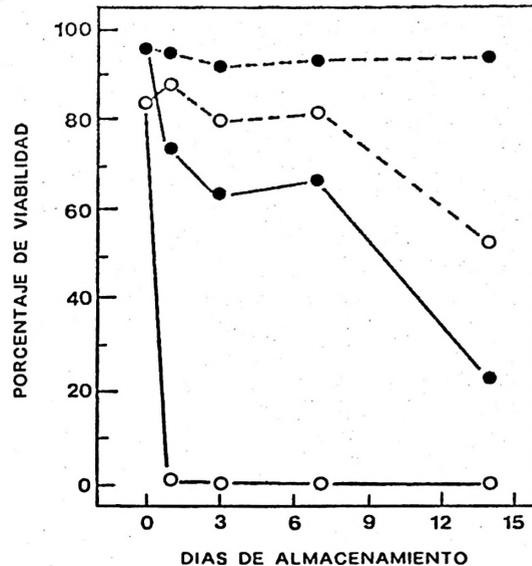


Fig. 2. Viabilidad de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. *Peredovik*) almacenadas a 65 °C (●) y 90 °C (○) determinada por la prueba cualitativa del tetrazolium (TTC), expresada como porcentaje de semillas total y parcialmente coloreadas (- - -) y ensayo de germinación expresado como porcentaje de plántulas normales (—). Cada punto representa el valor medio de 5 y 4 repeticiones, cada una con 20 y 25 semillas, respectivamente.

de germinación y prueba cualitativa del TTC se presentan en la figura 2. La viabilidad de las semillas disminuye con el tiempo de almacenamiento, siendo nula en las semillas tratadas a 90 °C a partir de las 24 h del inicio del almacenamiento. No hay correspondencia entre estos ensayos, la cual viene dada por el alto porcentaje de semillas parcialmente coloreadas, lo que se traduce en una sobreestimación de la capacidad germinativa, tanto mayor cuanto mayor es el deterioro.

Discusión

El estudio estadístico de los resultados indica que la disminución de la actividad

MDH es más acusada en las semillas de girasol almacenadas a 90 °C, lo que refleja la severidad del tratamiento; que el almacenamiento a 65 y 90 °C afecta más a la actividad MDH en la fracción soluble; y que las semillas muestran una cierta tolerancia al almacenamiento a 65 °C, que se manifiesta por la disminución sostenida y no significativa de la actividad MDH mitocondrial. La mitocondria es un orgánulo de doble membrana, lo que podría explicar que se eviten, de alguna manera, las posibles alteraciones enzimáticas, en comparación con el deterioro que se produce en la fracción soluble, de naturaleza mayoritariamente citosólica. Se han observado variaciones semejantes de las alteraciones en enzimas marcadores de glioxisomas y mitocondrias en semillas de pino deterioradas por tratamiento térmico (7), que se mostraban diferentes en relación con el tiempo de tratamiento, afectándose más rápida y drásticamente la actividad isocitratoliasa presente en glioxisomas, orgánulo de membrana sencilla, en relación con la actividad de enzimas marcadoras mitocondriales como la citocromo-c-oxidasa. Estas variaciones estarían en consonancia con los cambios que se observan en semillas deterioradas y entre los que se citan las alteraciones de actividades enzimáticas y propiedades de las membranas (8, 9, 14, 15, 20, 21), incluyendo la pérdida de la actividad MDH en las semillas expuestas a altas temperaturas (50 °C) detectada en los lixiviados procedentes de éstas y, por tanto, de origen citosólico, y exudada al medio de incubación por las alteraciones a nivel de membrana (10).

Por otra parte, conviene señalar que estos resultados contribuyen a reforzar la idea de que la producción de TTC, basada en la actividad deshidrogenasa que utiliza NADP como coenzima, no es un procedimiento riguroso y fiable para determinar la viabilidad de semillas deterioradas o envejecidas (1). Estas pueden presentar una menor viabilidad sin una pérdida evidente

de la actividad deshidrogenásica, lo que produciría una sobreestimación de la viabilidad (fig. 2), observada también en otras semillas (2, 13, 18), y explicaría el alto porcentaje de semillas heterogéneamente coloreadas, como se pone de manifiesto en este caso por la baja correlación existente entre la capacidad germinativa y la actividad MDH detectada en la fracción soluble ($r = 0,6125$) y mitocondrial ($r = 0,1129$), lo cual sería contrario a las relaciones entre la actividad deshidrogenasa total, calculada a partir de la reducción del TTC, y la viabilidad de semillas señaladas por otros autores (3, 11). La variable selectividad del ensayo del TTC podría atribuirse a que los daños producidos a nivel de membrana contribuirían a una mayor penetración del compuesto en los tejidos y a un mayor movimiento del trifenílformazán producido a través de las semillas deterioradas (6, 22). No obstante, debe tenerse en cuenta que si bien la disminución de la actividad MDH no es necesariamente la única causa posible para la pérdida de viabilidad, como se ha indicado para las semillas de *Solanum nigrum* (10) y algodón (16), el descenso de la actividad deshidrogenasa total, junto con las alteraciones ocasionadas a otras proteínas esenciales y los cambios en la actividad glutatión reductasa (5), implicada en los procesos de envejecimiento, pueda considerarse parcialmente la causa de la pérdida de la capacidad germinativa observada en semilla envejecidas y/o deterioradas.

Finalmente cabe señalar que, aunque la determinación de enzimas puede permitir una acertada explicación sobre una de las causas del envejecimiento y posterior muerte de las semillas, los problemas derivados de su realización y coste limitan su utilidad como ensayo rutinario para predecir la capacidad germinativa de un lote de semillas, sobre todo, cuando el número de muestras es elevado. No obstante, este tipo de ensayos debido a su precisión y fiabilidad pueden ser utilizados en la evaluación de la calidad de semillas, espe-

cialmente en casos dudosos que pudieran dar lugar a divergencias entre productores y analistas oficiales.

Resumen

Se evalúa la actividad malato deshidrogenasa (MDH) en semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) almacenadas a 65 y 90 °C durante 1, 3, 5, 7 y 14 días, para conocer la utilidad de este test de viabilidad para semillas deterioradas. Se detectan diferencias en la resistencia al almacenamiento a altas temperaturas entre los distintos tratamientos como reflejan los cambios en la evolución de la actividad MDH. Se observa un descenso de la actividad MDH en las fracciones soluble y mitocondrial. Estas diferencias no están correlacionadas con la viabilidad de las semillas, determinada mediante el ensayo cualitativo del trifeniltetrazolium, lo cual podría estar relacionado con la integridad de las membranas celulares como refleja la diferente actividad MDH en las fracciones soluble y mitocondrial.

Palabras clave: Malato deshidrogenasa, Deterioro, Girasol, Semillas.

Bibliografía

- Bewley, J. D. and Black, M.: En «Physiology and Biochemistry of Seeds» (Bewley, J. D. and Black, M., eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1982, pp. 1-59.
- Bourland, F. M., Kaiser, G. K. and Cabrera, E. R.: *Seed Sci. Technol.*, 16, 673-683, 1988.
- Choudhuri, N. and Basu, R. N.: *Seed Sci. Technol.*, 16, 51-61, 1988.
- Davies, D.: En «Methods in Enzymology» (Sidney, P., Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., eds.), Academic Press, London, 1975, pp. 148-150.
- De Paula, M., Darder, M., Torres, M., Martínez-Honduvilla, C. J. and Feijoo, B.: *IV Portuguese-Spanish Biochemistry Congress*, Povia de Varzim (Portugal), 1991, pág. 15.
- Duke, S. H. and Kakefuda, G.: *Plant Physiol.*, 67, 449-456, 1981.
- Fernández García de Castro, M.: Efecto del envejecimiento en semillas de *Pinus pinea*. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid, 1978.
- Fernández García de Castro, M. and Martínez-Honduvilla, C. J.: *Physiol. Plant.*, 62, 581-588, 1984.
- Fu, J. R., Lu, X. H., Chen, R. Z., Zhang, B. Z., Lin, Z. S. and Cai, D. Y.: *Seed Sci. Technol.*, 16, 197-212, 1988.
- Givelberg, A., Horowitz, M. and Poljakoff-Mayber, A.: *J. Exp. Bot.*, 35, 1754-1763, 1984.
- Gorecki, L. R. and Harman, G. E.: *Seed Sci. Technol.*, 15, 109-117, 1987.
- ISTA. *Seed Sci. Technol.*, 13, 299-513, 1985.
- Mason, S. C., Vorst, J. J., Hankins, B. J. and Holt, D. A.: *Agron. J.*, 74, 546-550, 1982.
- Nautiyal, P. C. and Zala, P. V.: *Seed Sci. Technol.*, 19, 451-459, 1991.
- Nkang, A.: *Seed Sci. Technol.*, 16, 247-260, 1988.
- Perl, M.: *Israel J. Bot.*, 27, 54-61, 1978.
- Priestley, D. A.: *Seed ageing*. Cornell University Press, Ithaca, N. Y., 1986.
- Puřacka, S.: *Physiol. Plant.*, 82, 306-310, 1991.
- Ram, C. and Wiesner, L. E.: *Seed Sci. Technol.*, 16, 11-18, 1988.
- Torres, M., Frutos, G. and Durán, J. M.: *Envir. Exp. Bot.*, 31, 201-207, 1991.
- Torres, M. and Martínez-Honduvilla, C. J.: *Agr. Med.*, 120, 220-225, 1990.
- Woodstock, L. W.: *Proc. 13th Soybean Seed Res. Conf.*, Nueva York, 1983.

