

2ij. 1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN MAIZ



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C O

P R E S E N T A :

EVANGELINA CAMACHO FRIAS



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 está 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.

C O N T E N I D O ,

I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	
1. Germinación	7
2. Reguladores de crecimiento	20
3. Métodos de análisis	40
4. Métodos de extracción	59
III. PARTE EXPERIMENTAL	64
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	68
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES	94
VI. BIBLIOGRAFIA	97

INTRODUCCION

I N T R O D U C C I O N

Las plantas normalmente crecen y se desarrollan a través de un proceso muy complejo y ordenado. Esta es una de las muchas características que tienen los seres vivos y este crecimiento y desarrollo pueden afectarse por el medio ambiente, que en algunos casos, juega un papel muy importante al controlar o alterar estos procesos.

Aunque la naturaleza está altamente integrada en estos controles del proceso, los mecanismos por los cuales las plantas los registran, son muchos y muy complejos.

Uno de los sistemas de control de crecimiento y desarrollo más importantes, está dado por las moléculas llamadas hormonas vegetales.

El término "hormona", implica el concepto de mensajero químico (1). Las hormonas animales difieren de las vegetales en el número de vías por las que se sintetizan, y, posiblemente, lo más importante, es que las hormonas animales

son producidas por un órgano o glándula específicos y casi siempre tienen un efecto específico en un tejido usado como "blanco". En cambio, aunque las hormonas vegetales pueden sintetizarse en regiones muy restringidas, son elaboradas por células inespecíficas y frecuentemente tienen efectos diferentes sobre la planta, dependiendo de las circunstancias.

Debido a esto, estas moléculas se denominan también sustancias de crecimiento vegetal, fitohormonas, reguladores de crecimiento vegetal o fitorreguladores, que es el término más adecuado.

Estos fitorreguladores son metabolitos secundarios y para su estudio, se han dividido en grupos: auxinas, gibberelinas, citocininas, abscisinas y etileno.

Aunque durante la década pasada han recibido gran atención, una de las mayores dificultades que sigue habiendo al estudiarlas, es que se encuentran en concentraciones muy pequeñas, por lo que se necesitan grandes cantidades de materia prima para poder aislar una cantidad suficiente de fitohormona. Otro de los problemas, es que fuera de su medio se descomponen con gran facilidad. Sin embargo, se han desarrollado nuevas técnicas de análisis que permiten estudiar

a compuestos con mayor rapidez y con muy poca cantidad de muestra.

En este trabajo, se pretende establecer un método a través del cual se puedan extraer a las citocininas del maíz y posteriormente separarlas por cromatografía líquida de alta eficiencia, para identificarlas y cuantificarlas con ayuda de estándares.

También se intenta medir la variación en la concentración de citocininas en elote y en semilla madura durante la germinación, utilizando varios genotipos de semillas de maíz ya que es en la germinación donde se esperaría que ocurrieran cambios en los niveles de estas citocininas.

ANTECEDENTES

A N T E C E D E N T E S .

Aunque en este trabajo únicamente se estudiaron citocininas, es importante conocer a los demás grupos, ya que los fitorreguladores no actúan solos, sino que siempre interactúan en todos los procesos que regulan la vida de la planta.

Así, hablaremos brevemente de las características de cada grupo, y en forma más detallada, de las características de las citocininas.

También se mencionarán brevemente los métodos más comunes de análisis de estos fitorreguladores.

Además, como se pretende estudiar a estos reguladores durante el proceso de la germinación, se darán algunos detalles acerca de este proceso.

I. GERMINACION.

La germinación de las semillas se ha definido como la fase en la cual termina el estado de latencia y da principio el desarrollo de ésta semilla. La latencia es el período en el cual se detiene el proceso bioquímico del vegetal. La regulación de estos fenómenos es principalmente de tipo hormonal (2).

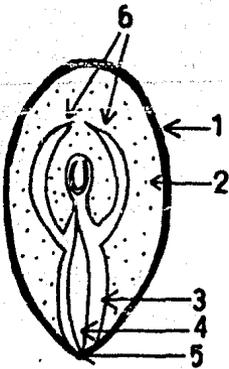
Una semilla consta de:

TEGUMENTOS.- Es la capa protectora, formada por dos cubiertas llamadas testa y endopleura (3).

ALBUMEN.- Es la masa de tejido nutritivo, constituido principalmente por carbohidratos, lípidos y proteínas. Las cantidades relativas de estos constituyentes, algunas veces dependen de factores ambientales, tales como el clima (3, 4).

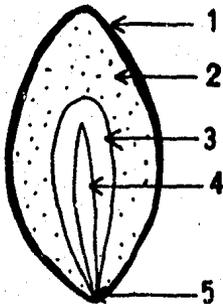
EMBRION.- Es la parte fundamental de la semilla. Consta de una serie de partes que formarán los órganos correspondientes en la planta adulta. Estas partes són: cotiledones

que pueden ser uno o varios, dependiendo de la especie y que darán lugar a las primeras hojas; el epicotilo, que dará lugar al tallo; el hipocotilo; y la radícula, que dará lugar a la raíz (3).



Sección longitudinal de una semilla dicotiledónea.

- | | |
|---------------|----------------|
| 1) Tegumentos | 5) Hipocotilo |
| 2) Albumen | 5) Radícula |
| 3) Epicotilo | 6) Cotiledones |



Sección longitudinal de una semilla monocotiledónea.

- | | |
|---------------|-----------------------|
| 1) Tegumentos | 4) Eje
embrionario |
| 2) Albumen | 5) Radícula |
| 3) Escutelo | |

1. CAPACIDAD DE GERMINACION EN LAS SEMILLAS.

Las semillas, generalmente se encuentran en un estado de desecación, en el que pueden retener su capacidad para germinar por un cierto período de tiempo. Este período puede ser desde algunos meses, hasta más de 200 años (2).

En general, la capacidad para germinar se retiene mejor si las semillas se almacenan de manera que su metabolismo disminuya radicalmente, es decir, a bajas temperaturas y en atmósfera de Dióxido de Carbono. Sin embargo, esta capacidad para germinar, no solo es función del modo de almacenamiento de las semillas. Las condiciones a que se exponen las plantas de las cuales provienen las semillas, pueden afectar profundamente la capacidad de germinación. Estas condiciones son: absorción de agua, temperatura, contenido de minerales en la planta y luz, entre otras. Sin embargo, estos factores ambientales no son tan importantes, comparados con el control genético de la semilla (4).

2. CONDICIONES DE GERMINACION.

Las semillas no pueden germinar si no existen ciertas

condiciones en el medio ambiente.

Entre los factores fundamentales para que ocurra el proceso de la germinación, se encuentran: humedad, composición de gases en la atmósfera, temperatura y luz (2, 3, 4).

HUMEDAD.- Una de las principales causas de latencia, es la ausencia de agua en la semilla. El primer fenómeno que ocurre durante la germinación, es la absorción de agua en la semilla (imbibición) (2).

El grado de imbibición está determinado por la composición de la semilla, la permeabilidad de su capa protectora al agua, y las propiedades de los coloides presentes en la semilla. La permeabilidad selectiva, o impermeabilidad de la cubierta protectora, es frecuentemente causa de latencia. Esta permeabilidad puede variar con la temperatura o con la luz.

La capacidad de las semillas de tomar agua del medio, es considerable, llegando algunas a retener varias veces su peso en agua (3).

Durante la imbibición, las moléculas de agua entran a la semilla para que ésta se hinche y se solvaten las partículas coloides, de tal forma que puedan difundirse dentro de esta semilla y den inicio los procesos enzimáticos (4).

El hinchamiento producido por la imbibición, da origen a considerables presiones, denominada presión de imbibición. Esta presión llega a ser de 100 atm y es de gran importancia en el proceso de la germinación, porque precisamente esta presión tan alta es la que rompe la cubierta protectora de la semilla.

GASES.- La germinación requiere un gasto de energía de las células. Esta energía normalmente se obtiene por procesos de oxidación, en presencia o ausencia de oxígeno, es decir, respiración o fermentación. Este proceso involucra un intercambio de gases: salida de bióxido de carbono en ambos casos, y entrada de oxígeno en el caso de la respiración. Por esta razón, la germinación de semillas se afecta grandemente por la composición de la atmósfera ambiental (5).

La mayoría de las semillas no germinará si la concentración de oxígeno disminuye apreciablemente. El efecto del bióxido de carbono es generalmente contrario al del oxígeno (4).

Se sabe que el etileno en pequeñas cantidades, promueve la germinación en algunas semillas. Se ha visto que inmediatamente después de la imbibición, se produce etileno. Este interactúa con los demás fitorreguladores.

El intercambio gaseoso también está determinado por la permeabilidad de la cubierta protectora de la semilla (4).

TEMPERATURA.- Es otro de los factores limitantes de la germinación, de tal manera que todas las especies tienen un intervalo óptimo, marcado por las temperaturas máxima y mínima. Este intervalo puede modificarse por factores externos (6).

A temperaturas muy altas o muy bajas, ninguna semilla germina. La máxima temperatura a la cual las semillas pueden germinar, es de 48°C. La temperatura mínima está poco definida, ya que el proceso de la germinación es muy lento a bajas temperaturas.

A diferencia de semillas que germinan a una temperatura definida, existen semillas que necesitan temperaturas alternadas para que puedan germinar. Sin embargo, en estas semillas el factor determinante es el cambio de temperaturas pero dentro de la semilla (4).

LUZ.- La mayoría de las semillas germinan igual en la oscuridad o en la luz. Pero otras semillas varían mucho en su comportamiento, si están en presencia de luz, o si están en la oscuridad (6)

Las semillas pueden dividirse entonces en: las que germinan en la oscuridad, las que germinan en la luz, las que necesitan períodos alternantes de luz y oscuridad y las que son indiferentes a la presencia o ausencia de luz para germinar.

Diferentes zonas del espectro afectan a la germinación en forma muy distinta. Se mostró que radiaciones con longitud de onda por debajo de los 290 nm inhiben la germinación de todas las semillas probadas. Radiaciones de longitud de onda entre 290 y 400 nm parecen no alterar el proceso de la germinación. Las radiaciones con longitud de onda de 560 a 700 nm, promueven la germinación, y parece que la luz azul la inhibe (4).

La sensibilidad de las semillas a la luz, parece que aumenta al aumentar el tiempo de imbibición. La respuesta de la semilla a la luz, depende de la intensidad y la duración de la iluminación.

La estimulación de la germinación por luz roja y su inhibición por luz infrarroja, puede repetirse muchas veces y siempre la naturaleza de la última iluminación decide si la germinación se lleva a cabo o no (4).

3. LATENCIA.

Se dice que las semillas se encuentran en un estado de latencia, por tener una actividad metabólica muy reducida. Este estado puede ser consecuencia de que la semilla tiene una cubierta protectora que es impermeable al agua o a los gases, a que la semilla no está en condiciones adecuadas de luz y de temperatura, o a la presencia de sustancias que inhiben la germinación. El más importante de los inhibidores de la germinación que se conoce, es el ácido abscísico (2).

Algunas semillas requieren de un período de almacenamiento antes de que puedan germinar. Este período se conoce como período de post'maduración y durante él, ocurren cambios fisiológicos, físicos y químicos en la semilla (4).

Otras semillas germinan inmediatamente después de su recolección si se someten a las condiciones adecuadas. Sin embargo, estas semillas pueden perder su capacidad de germinación inmediata y requerir de un cierto período de almacenamiento. A este fenómeno se le denomina latencia secundaria (4, 6).

Varias sustancias químicas pueden sustituir, completa,

o parcialmente la presencia de la luz en la ruptura de latencia, y también pueden anular los efectos de los inhibidores, y estimular así la germinación. Algunos de estos compuestos son de naturaleza simple, como nitrato de potasio o tiourea, y otros compuestos son de naturaleza compleja, como las giberelinas o las citocininas (4).

4. MECANISMO DE LA GERMINACION.

Las semillas secas se caracterizan por tener un metabolismo extremadamente bajo. Esto se debe probablemente a la casi completa ausencia de agua en las semillas. Sin embargo, las semillas secas son una unidad funcional capaces de realizar gran cantidad de reacciones bioquímicas, lo que se demuestra al iniciarse la hidratación y activarse las enzimas presentes, desarrollándose así muchos procesos bioquímicos (6).

El primer cambio metabólico fácilmente observable en las semillas, es el incremento de la respiración, de valores casi de cero, a valores apreciables (4).

El segundo efecto fácilmente observable, es la hidrólisis del material de reserva en la semilla. Esta reacción se

inicia con la hidratación de las proteínas.

Mientras las semillas están secas, casi no hay cambios en la composición química. Cuando las semillas se hidratan, hay grandes cambios en varias partes de la semilla. Los cambios ocurridos pueden ser de tres tipos: hidrólisis del material de reserva en la semilla, transporte de sustancias de una parte a otra de la semilla y la síntesis de nuevo material a partir de sustancias hidrolizadas (6).

En la germinación, la síntesis de proteínas es de especial importancia, debido a su relación con el metabolismo de ácidos nucleicos.

Las únicas sustancias que normalmente inician la germinación, son el agua y el oxígeno (4).

En muchos casos, hay una pérdida de sustancias en los inicios de la germinación, debido por un lado, a la oxidación de sustancias, y por otro, a su salida de la semilla (4).

Los minerales intervienen en el proceso sólo hasta que aparece la raíz. El peso seco de la plántula, aumenta sólo cuando los cotiledones o primeras hojas se exponen a la luz para que realicen la fotosíntesis (6).

En la semilla, el principal material de reserva son los

Lípidos y carbohidratos, y son de gran importancia durante la germinación.

La parte de la semilla que parece ser la que más rápido se desarrolla, es el hipocotiledón. El metabolismo de la radícula, aparece casi inmediatamente después de la hidratación (4, 6).

Existe una marcada movilidad de los diversos componentes de la semilla. También se observa una hidrólisis de lípidos durante los primeros días, pero después, estos lípidos se vuelven a sintetizar a partir de carbohidratos (4).

El contenido de ácidos nucleicos, puede decirse que disminuye en una parte y aumenta en otra parte de la semilla. También hay una reorganización de los diferentes ácidos nucleicos durante la germinación.

Los cambios metabólicos ocurridos en las primeras etapas de la germinación, son el resultado de la activación de varias enzimas. Las enzimas hidrolíticas y de transferencia están presentes en la semilla seca, pero se activan hasta que se imbibida ésta. La activación es muy rápida (4).

Algunas enzimas se sintetizan de novo en la capa de aleurona y otras, se controlan por medio de las sustancias de

crecimiento (fitorreguladores). En forma general, las enzimas involucradas en la hidrólisis e interconversión de los carbohidratos y lípidos se activan durante la germinación, más que sintetizarse de novo (6).

Las enzimas proteolíticas de semillas germinadas, son de naturaleza diversa, considerando tanto su especificidad de asociación de péptidos, su pH óptimo y su reacción a inhibidores.

Cualquier tipo de enzimas transferasas de metabolismo de aminoácidos, se forma por las transaminasas. Estas enzimas transfieren grupos amino de aminoácidos y cetoácidos. Los cambios en la composición de aminoácidos libres en la semilla, pueden indicar el grado de desarrollo (4).

Los fosfatos juegan un papel muy importante en varias reacciones de la semilla. Estos fósforos son necesarios para la formación de ácidos nucleicos, que están íntimamente ligados a la síntesis de proteínas y la constitución genética de la célula (6).

En la semilla, el fósforo aparece en forma orgánica y hay muy poco en forma inorgánica. La liberación de fosfato orgánico es por medio de fosfatasas (6).

Durante la germinación, se requiere energía, que se

obtiene durante el proceso de respiración.

La respiración puede impedirse si la semilla tiene una cubierta protectora muy gruesa. En la mayoría de los casos, cuando se imbebe la semilla, se puede iniciar el proceso de la respiración (4).

Los factores externos que influyen en la respiración, son: temperatura, el contenido de oxígeno y bióxido de carbono en la atmósfera, y la luz. Cada uno de estos factores son responsables de los efectos de la respiración, a la vez que son diferencialmente dependientes del estado preciso de la germinación, durante el cual se examina su influencia (4).

La respiración es el proceso en el cual los sustratos se oxidan por una serie de pasos, con la participación de oxígeno como aceptor final de electrones y salida de bióxido de carbono.

Como puede observarse, el mecanismo de la germinación es muy complejo, y en él intervienen diversos factores que pueden alterar este proceso.

II. REGULADORES DE CRECIMIENTO.

i. AUXINAS.

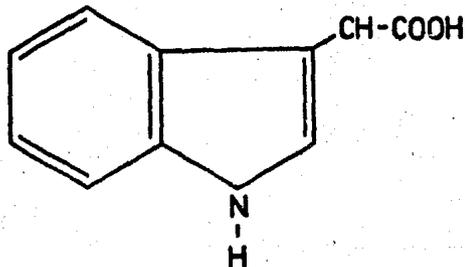
Estas son sustancias químicamente relacionadas al ácido indolacético (IAA) (1), que parece ser la auxina natural que más se encuentra en la mayoría de los vegetales.

El IAA se encuentra en dos formas: libre y conjugada, siendo la forma libre la activa y la conjugada la forma inactiva. La posible hidrólisis de la forma conjugada para que se tenga una auxina activa, podría sugerir un mecanismo de regulación de estos compuestos (7).

Las auxinas se caracterizan por promover el crecimiento... de las plantas. Su función también es retardar la dominancia apical y además, son responsables de la elongación y expansión celular (8). Se ha discutido mucho sobre el papel que juegan las auxinas en el proceso de la germinación de las semillas (8).

Muchos compuestos indólicos tienen efectos semejantes al IAA (I), pero existen también muchos reguladores de crecimiento sintéticos, que no tienen la estructura indólica, como el 2, 4-D (II) (1).

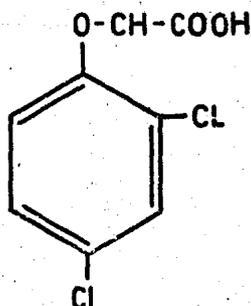
Las concentraciones a las que usualmente se encuentran las auxinas, són del orden de $1-10^3$ nanogramos por gramo de tejido fresco. Los principales problemas para hacer un análisis de estas sustancias son: la adsorción, oxidación química y la fotooxidación (9).



I

ACIDO INDOLACETICO (IAA)

AUXINA NATURAL



II

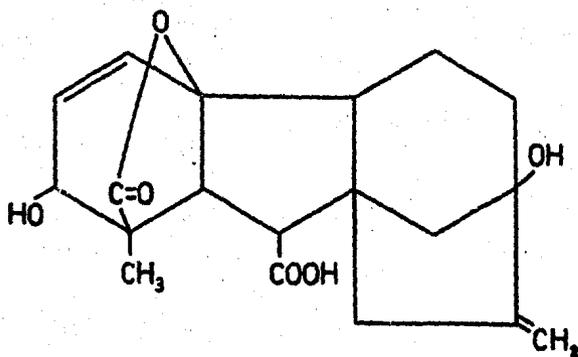
ACIDO 2,4-DICLOROFENOXIACETICO

(2,4-D) AUXINA SINTETICA

2. GIBERELINAS.

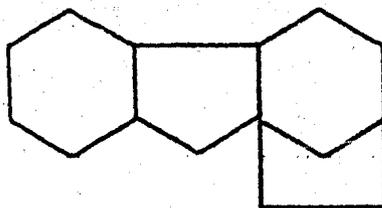
Estas s3n sustancias qu3micamente relacionadas con el 3cido giber3lico (usualmente abreviado GA₃) (III), que es un producto metab3lico del hongo Fusarium heterosuprum, tambi3n llamado Gibberella fujikursi (10) y puede obtenerse del medio l3quido en el cual ha crecido el hongo.

La mol3cula de giberelina contiene el esqueleto de gibano (IV).



III

ACIDO GIBERELICO



IV

ESQUELETO DE GIBANO

Algunas de sus funciones en el metabolismo de las plantas son: Regular la actividad de las hidrolasas, proteasas y RNA-polimerasa en el endospermo, y romper el período de latencia de las semillas (11). También provocan el crecimiento de los frutos.

Se ha propuesto que las giberelinas son los fitorreguladores más importantes en el proceso de la germinación (12).

En la actualidad, se conocen más de 50 giberelinas diferentes, que se designan por un número (GA_1 , GA_2 , GA_3 , ...) (9). En mayor o menor proporción, todas pueden provocar la elongación del tallo cuando se aplican a una planta completa en presencia de luz (1).

Existen muchos casos en los que se han extraído sustancias de algunas plantas con propiedades semejantes a las giberelinas conocidas, pero las cantidades aisladas no han sido suficientes para permitir su exacta identificación química y simplemente se denominan "Sustancias parecidas a las giberelinas".

Las giberelinas se encuentran en niveles de $1-10^3$ nanogramos por gramo de tejido fresco, y los principales problemas de análisis son su fácil oxidación y la existencia de muchas moléculas similares (9).

3. ABSCISINAS.

Las abscisinas, también llamadas inhibidores, están representadas por el ácido abscísico (V).

Se han dado a conocer una gran variedad de sustancias inhibidoras de la germinación y crecimiento en las plantas (13), pero desde el punto de vista fisiológico, el más importante de los inhibidores es el ácido abscísico (ABA), que fue conocido primero como abscisina II.

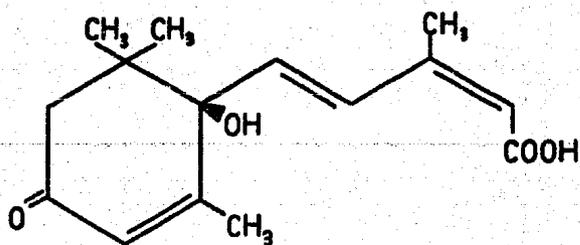
Las abscisinas o inhibidores en general, provocan la latencia embrionaria e impiden muchas de las respuestas de las plantas a las giberelinas, citocininas y auxinas.

Durante la germinación, el ABA actúa de la siguiente manera: Prolonga el estado de latencia e inhibe la síntesis de enzimas necesarias en la germinación de las semillas (14).

Los efectos inhibitorios del ABA durante la germinación se invierten por la acción del GA_3 y kinetina (citocinina sintética).

Los niveles en que se encuentran son de $1-2 \times 10^4$ nanogramos por gramo de tejido fresco, y los problemas de análisis de estas sustancias son: la adsorción y la isomerización

de la configuración del pentadieno (9).



V

ACIDO ABCISICO (ABA).

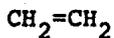
4. ETILENO.

Desde hace muchos años, se sabe que el etileno tiene gran influencia sobre el crecimiento de las plantas.

Ya en 1935 se sugirió que el etileno podría considerarse como una hormona, pero las dificultades de detectar y medir las pequeñísimas cantidades de etileno involucradas en muchos procesos vegetales ha sido un gran impedimento para su estudio. Sin embargo, gracias a que en la actualidad se han desarrollado técnicas muy finas de análisis, se pueden determinar concentraciones de este compuesto.

El etileno está involucrado en muchas de las respuestas de inducción de las auxinas, actúan en la senescencia de las hojas y en la abscisión y maduración de algunos frutos (15).

Las dificultades de su análisis son: Es un gas volátil y se contamina con muchos plásticos y polímeros (9).



VI

ETILENO.

5. CITOCININAS.

Con base en el conocimiento de la función de las auxinas y giberelinas, se sugirió en 1892 la presencia de un regulador químico implicado en la división celular.

En 1954, Haberlandt (16), obtuvo del tejido parenquimatoso, un material que provocaba la división celular.

En 1954, Skoog y sus colaboradores (17), repitiendo este experimento "in vitro", pusieron de manifiesto la presencia de una sustancia que regula la división celular y demostraron que esta no se lleva a cabo en ausencia de dicha sustancia.

En 1955, Miller y sus colaboradores (18), separaron del DNA de esperma de arenque, al primer regulador de la división celular, al cual denominaron kinetina, que resultó ser la 6-furfuril-amino-purina. Otros estudios probaron que la kinetina no es una citocinina natural. La primera citocinina natural que se conoció, fue entonces la zeatina, descubierta por Letham en 1963, a partir de granos de maíz (19). Después se han aislado varias citocininas de tejidos vegetales.

Las citocininas son consideradas como reguladores de

crecimiento vegetal, las cuales regulan la división celular (citoquinesis). Su papel dentro de las plantas se ha estudiado y reconocido poco a poco y se ha visto que participan en el alargamiento o elongación celular, diferenciación de tejidos, latencia, floración, regulación de la senescencia y estimulación en la expansión del cotiledón (1, 2).

En 1955, se propuso el término "kinin" (cinina) como nombre genérico para sustancias naturales o sintéticas con actividad semejante a la kinetina.

Posteriormente, se dió este mismo nombre a un grupo de sustancias de origen animal y con propiedades fisiológicas muy diferentes a la kinetina.

Debido a la gran confusión que esto originó, se propuso el término citocinina como un término genérico para reemplazar a la palabra "kinin" para designar a todas las sustancias con actividad biológica parecida a la kinetina (20). Este término se basa en la actividad biológica de estas sustancias: la promoción de la división celular vegetal y probablemente también en algunas células de origen animal (20).

Se reconoce que la actividad de estos compuestos se puede

expresar también por otros medios: como alteraciones en el metabolismo, actividad enzimática o contenido del ácido nucleico en el alargamiento celular, en inducción de formación de órganos, en aparición de dominancia apical, en movilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos y en un incremento en la longevidad de tejidos y órganos (20).

La mayoría de las citocininas aisladas de plantas superiores se han obtenido también por hidrólisis del t-RNA. La δ, γ -dimetil-alil-adenina se encontró en el t-RNA de levadura y en las plantas superiores. De la semilla de Lupinus luteus, se ha aislado la dihidrozeatina y la metiltiozeatina se aisló del t-RNA de trigo (2, 21).

Los embriones y frutos jóvenes son las fuentes más comunes de citocininas. También se encuentran en las raíces, especialmente en los primeros milímetros de la punta de éstas (21).

ACTIVIDAD CITOCINETICA.

Se piensa que las citocininas naturales se sintetizan en la raíz y se mueven a otras partes de la planta a través de la corriente de transpiración. Fóx (22), clasifica a

los efectos biológicos de las citocininas de la siguiente manera:

DIVISION CELULAR.- En estudios detallados de la mitosis se ha encontrado que la kinetina, junto con el IAA inducen a la división celular (1). Así, mediante la división celular, las citocininas estimulan el crecimiento de la planta (23, 24).

ALARGAMIENTO CELULAR.- Poco después de observar el efecto de la kinetina en la división celular, se comprobó que este compuesto y algunos de sus análogos activos, producían alargamiento o elongación celular en hojas etioladas. Este efecto no lo presentan las auxinas (25).

INDUCCION DE LA FORMACION DE ORGANOS.- En condiciones apropiadas, ciertas variedades de cultivos de tejido responden a las citocininas con la formación de órganos. Esto se observó por primera vez en estudios de cultivos de callo de tabaco (25), En este sistema, cuando las citocininas y las auxinas se encuentran en determinada proporción, el tejido crece como un callo amorfo no diferenciado. Aumentando la proporción de citocinina con respecto a la auxina, se forman brotes, los cuales pueden transformarse en tallos y finalmente en plantas completas. Si en vez de aumentar disminuye la cantidad

de citocinina, entonces aparecen las raíces. Se ha encontrado que las citocininas estimulan el fenómeno de la formación de órganos femeninos en algunas plantas (25).

RUPTURA DE LA LATENCIA.- Se ha visto en algunos casos, que las citocininas pueden sustituir el requerimiento de luz necesaria para romper la latencia, ya que invierten los efectos de ciertos inhibidores de la germinación de semillas (21).

PERDIDA DE LA DOMINANCIA APICAL.- Las citocininas contrarrestan la dominancia usual del brote apical (2). La causa de estos efectos no es clara; aparentemente está relacionada con la actividad de las citocininas en la diferenciación del tejido vascular. No se conoce la interacción de las citocininas con los demás reguladores de este sistema (21).

AUMENTO DE LONGEVIDAD EN TEJIDOS Y ORGANOS.- Las alteraciones en el metabolismo, en la actividad enzimática, en el contenido de ácidos nucleicos y en la movilidad de materiales orgánicos e inorgánicos, producidos por las citocininas, modifican la longevidad de tejidos y órganos vegetales.

Aparentemente las citocininas no se degradan en las hojas, y cuando se aplica en un área determinada, difícilmente se mueve de ahí. Posiblemente esto contribuye a que aumente

la longevidad de la planta (26).

CITOCININAS NATURALES.

Después del descubrimiento de la kinetina, varios investigadores empezaron a buscar las sustancias naturales responsables de la división celular en las plantas.

Como ya se mencionó, en 1963, Letham (19) aisló por primera vez a la zeatina (VII) del maíz. Posteriormente se ha aislado de espinacas, chícharos, semillas de calabaza, girasoles y agua de coco.

También se ha aislado su ribósido, que es como generalmente se encuentra (9-ribosilzeatina) (VIII).

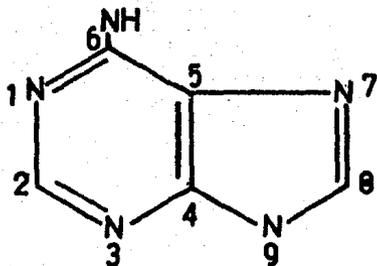
En 1967, Koshimizu (27), aisló la (-)dihidrozeatina (IX) y su ribósido correspondiente (X) a partir de frutos inmaduros de Lupinus luteus.

Con anterioridad, se había reportado el aislamiento de la togolamina (XI), junto con los alcaloides esteroides de una planta africana (28).

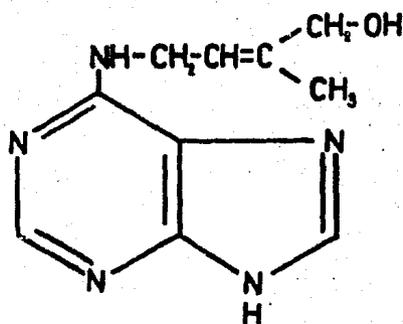
Otras citocininas que se han aislado e identificado son: la 6-(δ , δ' -dimetil-alil-amino)-purina (XII), comúnmente conocida como isopenteniladenina y su ribósido (XIII), conocida

como isopenteniladenosina; la 3-7-dimetil-2-metil-6-purina (XIV), este derivado no está sustituido en la posición 6 con la amina; la 6-(4-hidroxi-3-metil-2-butenilamino)-2-metil-9- β -D-ribofuranosilpurina (XV); y otras.

Actualmente, el aislamiento de citocininas naturales continúa.

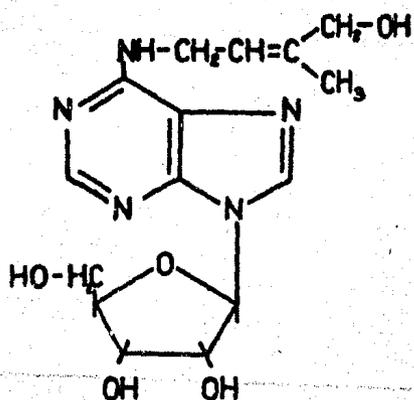


6-AMINOPURINA

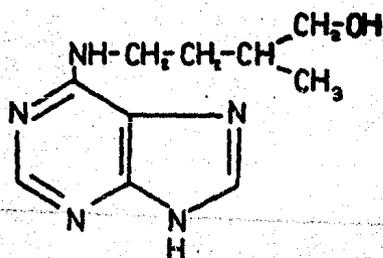


VII

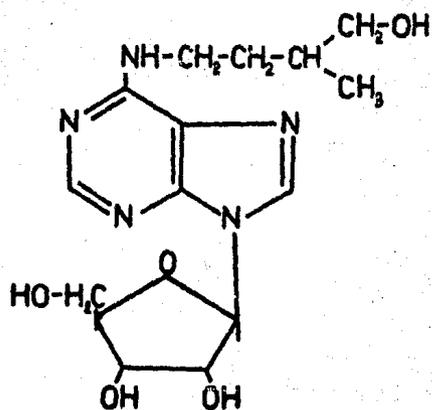
ZEATINA



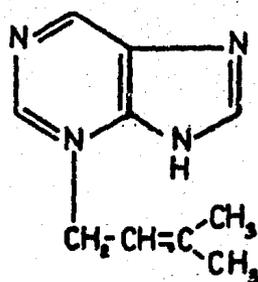
VIII
9-RIBOSILZEATINA



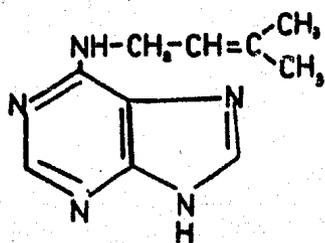
IX
DIHIDROZEATINA



X
DIHIDROZEATINA RIBOSIDO

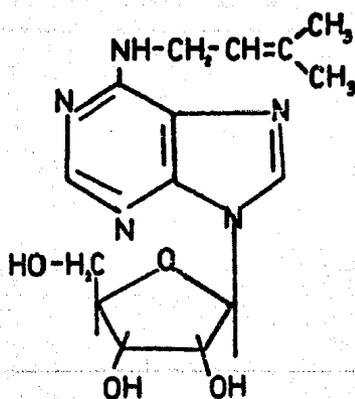


XI
TOGOLAMINA



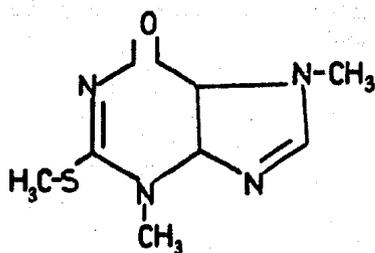
XII

ISOPENTENILADENINA

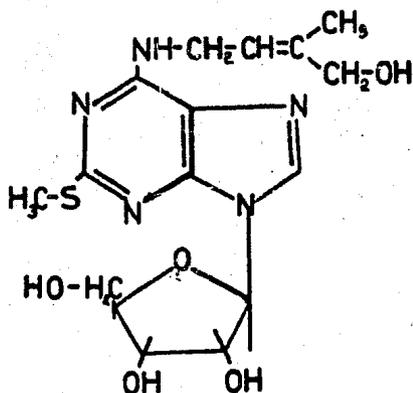


XIII

ISOPENTENILADENOSINA



XIV

3,7-DIMETIL-2-METILTIO-6-
PURINONA

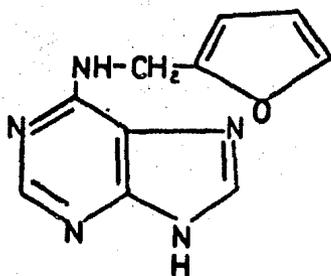
XV

6-(4-HIDROXI-3-METIL-2-BUTE-
NILAMINO)-2-METILTIO-9- β -D-
RIBOFURANOSIL-PURINA.

CITOCININAS SINTETICAS.

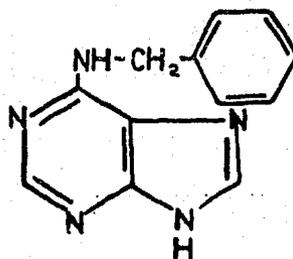
Poco después del descubrimiento de la kinetina, varios grupos de investigadores sintetizaron un gran número de compuestos análogos, probando su actividad citocinética.

Como resultado de estos trabajos, se han encontrado innumerables compuestos con propiedades de inducir la división celular, tales como las que se muestran a continuación:



XVI

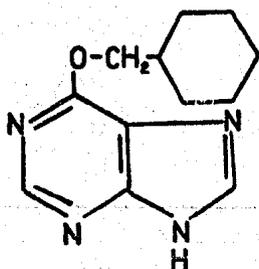
KINETINA



XVII

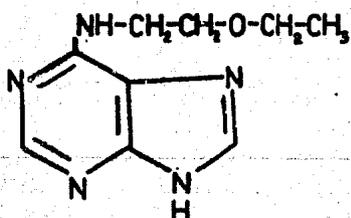
N-BENCILADENINA

(6-FURFURIL-AMINO-PURINA).



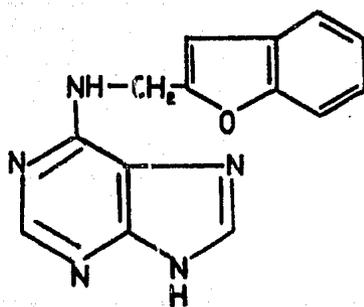
XVIII

6-BENCIL-OXI-PURINA



XIX

ETOXIETIL-ADENINA.



XX

BENZOFURFURIL-AMINO-PURINA.

RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Las citocininas naturales conocidas, son compuestos derivados de la adenina. Ciertas sustancias sintéticas han mostrado tener actividad citocinética, y esto incluye no solo a derivados de adenina tales como la kinetina, sino también feniluréas sustituidas, que son muy diferentes a la adenina en su naturaleza química.

Se hicieron estudios sistemáticos a más de cien análogos de la kinetina y se encontró que la estructura de adenina es esencial para mantener sus propiedades como fitorregulador. Además, se encontró que cambiando los sustituyentes del grupo 6-amino de la adenina, se obtenían compuestos activos, no así si se sustituye otra posición de la molécula (2).

La presencia de un grupo furfurilo unido a la posición N-6 de la adenina, aumenta la actividad de estos compuestos, lo mismo que si en esta posición se tiene una cadena que contenga un doble enlace.

Cuando está sustituida la posición N-6 de la adenina (por ejemplo zeatina o isopenteniladenina), el número óptimo de átomos de carbono de la cadena unida a este sitio es de cinco. Aumentando la longitud de la cadena hasta diez átomos

de carbono (es decir, 6-decil-aminopurina), las citocininas reducen su actividad a niveles escasamente detectables (2, 21).

No sólo las adeninas 6-sustituídas, sino también las 1-sustituídas han mostrado actividad citocinética. Sin embargo, es posible que los compuestos 1-sustituídos puedan transformarse, por acción enzimática, a adeninas 6-sustituídas y la actividad puede deberse a este cambio.

Para que las fenilureas posean actividad, se necesita tener un grupo $-NH-CO-NH-$ y un anillo bencénico.

Es difícil distinguir a primera vista, qué tienen en común estos derivados con los de adenina, pero algo que se relaciona entre ellos, es el enlace $-N-C-N-$ que en los derivados de adenina son cuatro y en las fenilureas uno. Los seis miembros del anillo de pirimidina de la adenina pueden ser análogos a los del anillo de fenilo en las fenilureas; y el 6-amino de la purina, análogo a un sustituyente meta en las fenilureas (2).

III. METODOS DE ANALISIS.

Los análisis de fitorreguladores se dirigen principalmente al aislamiento, purificación e identificación de estos.

Como ya se mencionó con anterioridad, uno de los problemas básicos en el estudio de sustancias endógenas de crecimiento, son las cantidades tan pequeñas que se tienen en la naturaleza, que generalmente son del orden de nanogramos por gramo de tejido fresco.

Los métodos empleados para extraer y purificar estas hormonas son muy variados. Una de las dificultades para seleccionar el procedimiento de extracción adecuado, es que estas sustancias pueden ser de composición química desconocida. Además, es muy difícil que los procedimientos de análisis no alteren la estructura y propiedades del material. Por ello, es muy importante que se seleccione la técnica de análisis más adecuada a cada caso.

1. METODOS DE SEPARACION.

A pesar de que la separación es un paso esencial para

poder identificar a las hormonas, realmente se han desarrollado pocos métodos de aislamiento.

La intención de todo proceso de extracción, es separar a las sustancias que nos interesan de los demás componentes presentes en la muestra, con la menor pérdida posible. Para ello, las técnicas más comunes son: difusión y extracción con disolventes.

DIFUSION. Por este método, el órgano o tejido del cual se va a extraer la sustancia, se corta y se coloca por el lado en que se cortó, sobre un medio de agar, que se puede cambiar cada cierto tiempo.

Una vez que la sustancia de interés se movió desde el tejido, se extrae del agar por otros medios, o se puede hacer el bioensayo sobre el agar.

Esta técnica tiene la ventaja, de que cuando la mayoría de las sustancias presentes en el tejido no se difunden al agar, bajo condiciones apropiadas podemos separar las sustancias que nos interesan. Esta técnica se puede utilizar para calcular la cantidad de compuesto que se tiene en cierta cantidad de tejido vegetal. La desventaja de este método, es

que sólo se aplica con buenos resultados a pequeñas cantidades de tejido (1).

EXTRACCION CON DISOLVENTES. El principio empleado aquí es que cuando se tienen dos disolventes inmiscibles entre sí (polares o fase acuosa y no polares o fase orgánica), la sustancia que se estudia pasa casi completamente a uno de los disolventes, dependiendo del coeficiente de partición que se tenga en ese sistema en particular. Ya que diferentes sustancias tienen diferentes coeficientes de partición, se pueden hacer una serie de transferencias de un disolvente a otro para separar la sustancia que nos interesa.

Ajustando el valor de pH del disolvente polar, podemos alterar el coeficiente de partición de ese sistema (1).

Los disolventes utilizados, valores de pH y otros detalles, dependen de los compuestos que se quieran extraer.

Cualquiera que sea el método de extracción, debe seleccionarse muy bien para evitar que los compuestos que nos interesan se hidrolicen, o sufran algunas alteraciones durante la extracción (29).

2. METODOS DE PURIFICACION.

Una vez que las hormonas vegetales se extraen del tejido, casi siempre se hace necesaria una purificación y ésta generalmente se hace por alguna forma de cromatografía. En cada caso, la mezcla que se quiere purificar se mueve a lo largo del medio adsorbente con ayuda de un disolvente apropiado y así se separan diferentes compuestos de acuerdo a su solubilidad en el disolvente y a su afinidad por el adsorbente.

CROMATOGRAFIA EN PAPEL Y EN CAPA FINA.

Las cromatografías en papel (CP) y en capa fina (CCF), son las técnicas más frecuentemente empleadas en la purificación de fitorreguladores cuando se quiere hacer una estimación por bioensayo (30).

Ambas técnicas muestran un excelente poder de resolución para compuestos de estructura muy similares, como por ejemplo, los isómeros de zeatina-7- β -D-glucósido y zeatina-9- β -D-glucósido (31).

La rapidez y bajo costo de estas técnicas, hacen que sean muy usadas. Sin embargo, no se recomiendan estas técnicas

si se quieren recuperar compuestos muy polares, ya que los rendimientos són muy bajos y variables.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.

En muchos análisis de hormonas vegetales, la cromatografía en columna de alguna manera se ha incorporado como un paso de purificación. La eliminación de compuestos fenólicos y pigmentos, són dos de las muchas razones existentes para el uso de éstas columnas.

La polivinilpirrolidona insoluble (PVP), es uno de los materiales más frecuentemente empleados en el empaquetamiento de columnas y generalmente se eluyen con buffers acuosos para eliminar fenoles y pigmentos (32). La PVP también se puede utilizar en el método de barrido, en el cual se impregna este material con el extracto vegetal, y después se separa por filtración (33).

Otro material muy utilizado en el empaquetamiento de columnas, es el Sephadex LH-20 para purificación de citocininas (34), giberelinas (35), y para los derivados del IAA (36). La técnica se describió originalmente como cromatografía de adsorción, pero como con disolventes polares como

fase móvil tienen un mecanismo de separación de fase inversa (compuestos polares eluyen antes que los compuestos no polares), dejó de llamarse así (31).

Las columnas de intercambio iónico es otra forma de purificación de los fitorreguladores. McDougall y Hillman (37) encontraron a la DEAE-celulosa superior al PVP para eliminar pigmentos vegetales y recuperar el IAA de extractos del tejido vegetal. Estas columnas poseen también una gran capacidad de muestra y dan buena separación del IAA esterificado con azúcares, si el material que se utiliza es Dowex 50 (38). La recuperación de pequeñas cantidades de citocininas bases y nucleósidos a partir de resinas de intercambio catiónico no es cuantitativa (30), en cambio, la celulosa fosfato es el material más adecuado para este tipo de purificación. Un material de intercambio aniónico que casi no se utiliza, es la Duolita, que permite la total recuperación de las citocininas (39). En este tipo de columnas, debemos tomar en cuenta que además del material de intercambio iónico adecuado debemos usar el eluyente en su forma iónica lo más "suave" posible para evitar la hidrólisis de los compuestos que queremos purificar.

La cromatografía de adsorción utilizando carbón (29), celita (40) o sílica gel (41), se utilizan en la purificación de ABA, zeatina y giberelinas respectivamente. Sin embargo, éstas purificaciones sólo se recomiendan en análisis cualitativos, ya que la recuperación es baja debido a la alta afinidad de estos compuestos al material de adsorción.

La cromatografía por exclusión de tamaño (CET), utiliza columnas empacadas con cuentas biológicas y se utiliza para separar a las hormonas de los demás componentes del extracto. Los compuestos se separan de acuerdo a su tamaño molecular. Se ha reportado una buena recuperación por este método (29).

Para la purificación de fitorreguladores también se han utilizado las cromatografías de gases y líquidos de alta eficiencia, pero se utilizan más en la identificación de estos compuestos. Estos métodos, que en la actualidad son los más utilizados, se comentarán más adelante.

3. METODOS DE IDENTIFICACION.

La identificación de las hormonas vegetales se lleva a cabo por medios biológicos y/o por medios fisicoquímicos.

MEDIOS BIOLÓGICOS.

Los medios biológicos generalmente se hacen por bioensayo o por ensayo inmunológico.

BIOENSAYO. Todos los grupos conocidos de fitorreguladores se descubrieron por su actividad biológica en ciertos sistemas de prueba. Como resultado, se han desarrollado numerosos bioensayos para estos compuestos.

Un ensayo biológico o bioensayo consiste en medir la respuesta que un órgano o tejido tenga al ponerse en contacto con la sustancia sometida a prueba. Se obtiene así una curva patrón que relaciona la respuesta del organismo y la dosis de sustancia que nos interesa.

Sin embargo, los bioensayos tienen muchos problemas inherentes. La precisión es mala por la variación del tejido vegetal, que es la base del bioensayo. Muchos de ellos tienen selectividad limitada o no definida, por lo que se necesitan ciertas condiciones de purificación para obtener datos confiables. Cualquier impureza en los extractos biológicos, incluyendo inhibidores u otras moléculas activas, pueden conducirnos a una interpretación equivocada de los resultados (9).

ENSAYOS INMUNOLOGICOS. estos ensayos inmunológicos se aplicaron originalmente al estudio de hormonas animales, y posteriormente, al estudio de fitorreguladores.

En principio, parece ser un método ideal para el análisis cuantitativo de los fitorreguladores, por su rapidez, precisión, selectividad, sensibilidad, y el compuesto no necesariamente debe estar puro. Además, este método permite analizar grandes cantidades de muestra.

Para este método, se necesita la formación de un anticuerpo para la sustancia que nos interesa. Sin embargo, debido a que los fitorreguladores son moléculas pequeñas, es difícil obtener un anticuerpo específico. Por esta razón, se necesi ta unir este compuesto a una molécula grande, por medio de un enlace covalente. Esta molécula generalmente es una proteina. Las proteínas más usadas son la albúmina sérica bovina (BSA) y la albúmina sérica humana (HSA). Este complejo hormona-proteina se inyecta posteriormente a un conejo, de tal manera que se estimule la formación de un anticuerpo. La posición del enlace entre las hormonas y la proteina es determinante para la selectividad del anticuerpo formado (29, 30).

En la mayoría de los ensayos inmunológicos, la cuantificación de estas sustancias, es por medio de la formación de un complejo hormona-enzima, que reacciona con el anticuerpo. La actividad de enzima detectada es inversamente proporcional a la cantidad del compuesto en la muestra (30).

El principal problema de esta técnica, es la formación, del anticuerpo específico a cada fitorregulador.

MEDIOS FISICOQUIMICOS.

Durante la década pasada, los métodos fisicoquímicos en el análisis de fitorreguladores, han tenido gran aceptación y un gran desarrollo. Estos métodos se han aplicado a todos los grupos de fitorreguladores, ya que nos ofrecen sensibilidad, precisión y rapidez de análisis, casi imposible de obtener por bioensayos. La mayoría de estas técnicas se basan en estudios de cromatografía de gases y cromatografía de líquidos.

CROMATOGRAFIA DE GASES. La cromatografía de gases (GC), fue una de las primeras técnicas fisicoquímicas usadas en la cuantificación de fitorreguladores.

Para estudiar a los fitorreguladores por éste método, se necesita, con excepción del etileno, que se forme un derivado volátil de estas sustancias. Las derivaciones más comunes, son la siliilación, alquilación y acetilación (9).

Al principio, este análisis se hacía sobre columnas empacadas, pero estas se sustituyeron por columnas capilares, que aumentaron la eficiencia y rapidez de separación (29).

La cromatografía de gases se denomina cromatografía de gas-líquido (GLC), cuando las paredes de la columna se recubren con una capa de líquido no volátil. El líquido utilizado como fase estacionaria, puede ser de diferentes polaridades.

Una de las dificultades de éste método para cuantificar a las hormonas vegetales, es la preparación de los derivados, ya que se necesita que tanto los reactivos como los compuestos a analizar, estén muy puros para obtener datos reproducibles.

DETECTORES UTILIZADOS EN CROMATOGRAFIA DE GASES. El detector de ionización a la flama (FID), utilizado en la

mayoría de los análisis por GC, detectará a todos los compuestos que se ionicen por combustión en flama de hidrógeno. Aunque estos detectores son muy sensibles (llegando a detectarse nanogramos), son poco selectivos. Debido a esto, se necesita que los compuesto a analizar, tengan una gran pureza para obtener datos confiables (29, 30).

Los detectores por captura de electrón (ECD), responden sólo a compuestos que son electronegativos. Estos detectores son tanto selectivos como sensibles, ya que detectan cantidades de picogramos. El ABA-Me, es la única hormona vegetal que tiene naturaleza electronegativa, por lo que puede cuantificarse muy bien por este método (29). Sin embargo, dado que los ECD son muy sensibles a compuestos orgánicos halogenados, éste método se ha aplicado a fitorreguladores susceptibles de halogenación (con trifluoroacetatos y heptafluorobutiratos). De esta manera, se puede aumentar el límite de detección de estos compuestos de 10 a 100 veces. No obstante, cualquier otro compuesto presente en la muestra susceptible de halogenarse, alterará los resultados obtenidos.

El detector de ionización a la flama alcalina (NPD), puede detectar selectivamente moléculas que contengan nitrógeno

y fósforo. Esta técnica se ha usado en la cuantificación de citocininas (44) y auxinas (45). Los límites de detección reportados són del orden de picogramos, y además, se tiene una selectividad mayor que con FID.

El espectrómetro de masas (MS), es el detector más selectivo que puede acoplarse al GC. La introducción de este sistema revolucioó el campo del análisis de fitorreguladores. Esta técnica combina el poder de separación de la GC y la selectividad del MS.

Aquí, los compuestos són ionizados y fragmentados dentro del espectrómetro de masas, y éstos iones fragmentados se separan y analizan, de acuerdo a su relación masa-carga (m/e). Estos fragmentos específicos y su intensidad relativa, dan un espectro de masas, particular de cada compuesto. Así, el espectro de masas obtenido, puede compararse con espectros conocidos para identificar a la muestra.

Como la mayoría de los fitorreguladores són sustancias poco volátiles, para analizarse por GC, se necesita formar un derivado volátil, por lo que la fragmentación obtenida en el espectro de masas será característico del derivado preparado, y no del compuesto inicial.

Los espectros de masa obtenidos de muestras vegetales, pueden considerarse como referencias, si los compuestos están libres de impurezas.

En la actualidad, se utiliza este instrumental acoplado a computadoras, facilitando así el análisis de los resultados (9).

Ultimamente, se ha introducido un aparato de análisis infrarrojo como detector de GC (GC/FT-IR), para identificar a los fitorreguladores. Esta técnica puede ser de mucha ayuda en los casos donde los espectros de masas nos dan poca información para la identificación del compuesto. Esto es común en el caso de las giberelinas y compuestos relacionados, ya que tienen muchos isómeros estructurales. De esta manera, la GC-MS y la GC/FT-IR, nos proporcionan información fundamentalmente para compuestos que no pueden detectarse por otros medios (9).

CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).- Es indudablemente el método más poderoso y versátil en el análisis de fitorreguladores.

La HPLC no sólo ofrece un alto poder de resolución,

sino que también se pueden recuperar considerables cantidades de muestra en poco tiempo. Por ello, ésta técnica se ha utilizado tanto en el aislamiento, como en la identificación de estos compuestos, pudiendo cuantificar a todos los fitorreguladores, excepto el etileno.

Se ha utilizado una gran variedad de material de empaquetamiento para columnas de HPLC, representando así todos los modos de separación que se conocen para la cromatografía en columna.

HPLC, FASE NORMAL.- Este sistema, es mucho más sensible y eficiente que el original fraccionamiento por columna, pudiendo separarse muestras multicomponentes de menos de 100 nanogramos.

Esta técnica tiene un mecanismo algo complejo, debido en parte a la inestabilidad de la fase móvil sobre el soporte. Por eso, se prefiere que el material de empaquetamiento, tenga fases enlazadas polarmente. El material más usado es la sílica-gel, que se enlaza covalentemente a algún sustituyente polar. Ejemplo de estos materiales són: Partisil 10, Partisil PAC, y Bondapak-NH₂ (29).

Esta técnica se usa principalmente en el aislamiento e

identificación de giberelinas (29).

HPLC, FASE INVERSA. El uso limitado del material de empaquetamiento en fase normal para HPLC, se debe al gran desarrollo de la separación fase inversa de HPLC.

A partir de 1975, la cromatografía fase inversa, ha tenido una gran importancia en la separación de fitorreguladores. Una de las razones de la popularidad de ésta técnica, es que puede utilizarse como fase móvil, disoluciones acuosas, lo que favorece al análisis de muestras vegetales debido a su naturaleza predominantemente acuosa. La facilidad de seleccionar la fase móvil, permite determinar las condiciones de separación, para el aislamiento de compuestos que difieren muy poco en su estructura (9).

El material de empaquetamiento, está constituido principalmente por partículas de sílica-gel como fase enlazante, recubiertas por hidrocarburos. Los materiales comerciales más conocidos son C₂, C₆, C₈, C₁₈ y C₂₂. El material más usado es el C₁₈ (octadecilsilano, ODS), probablemente porque es el que dura más tiempo (30).

Una de las propiedades más notables de este material, es que se puede hacer un mayor número de inyecciones, a

diferencia de otro tipo de material, y también los grandes volúmenes que pueden inyectarse a columnas relativamente pequeñas (10 mm de ancho por 25 cm de largo).

Esta técnica se ha usado en el aislamiento e identificación de: ABA y compuestos relacionados (46), citocininas (47), y giberelinas (48).

HPLC POR ADSORCION. A pesar del uso tan difundido de la cromatografía en capa fina en estudios de fitorreguladores, la HPLC por adsorción ha sido relativamente poco utilizada.

En general, los sistemas de disolventes para TLC, pueden usarse directamente en HPLC, aunque con algunas modificaciones para asegurar una rápida elución.

Esta técnica se ha usado en el análisis de ABA, citocininas y giberelinas (29), sin embargo, no se recomienda si es necesario utilizar un gran volumen de elución. Probablemente por esto y porque algunos sistemas de disolventes absorben luz UV, se ha limitado su uso (30).

HPLC POR INTERCAMBIO IONICO.- El material de empacamiento iónico, fue uno de los primeros materiales usados en HPLC, y se ha empleado en la separación de IAA, ABA y

citocininas (29).

Desafortunadamente, este material no es adecuado para la purificación de fitorreguladores, ya que se necesitan buffers no volátiles como eluyentes. De hecho, ésta técnica no se utiliza si queremos recuperar el compuesto puro. Otra cosa por la que ésta técnica no es muy utilizada, es que este material no es tan estable como otros tipos de empacamiento para HPLC (30).

DETECTORES HPLC.- El detector UV es uno de los más comúnmente usados, aunque éste método no sea muy selectivo.

Los detectores UV de longitud de onda fija, usualmente operan a 254 y 280 nm, que es donde absorben las citocininas, el ABA y el IAA. En cambio, las giberelinas sólo absorben a longitudes de onda menores de 220 nm, aunque se han hecho derivados de estos compuestos para que absorban a 254 nm. Si reaccionan otros componentes en la mezcla, pueden obtenerse datos equivocados. Se llegan a detectar cantidades de 0.5 a 5.0 nanogramos.

La detección por fluorescencia de las hormonas vegetales, especialmente indoles, ofrecen una mayor sensibilidad

y selectividad que las detecciones UV. La fluorescencia natural de los compuestos indólicos sólo se detecta si se hace un derivado. También se han hecho derivados de otros fitorreguladores. Las cantidades detectadas son del orden de picogramos (29).

Los detectores electroquímicos que operan en forma oxidativa, son también selectivos y sensibles, sobre todo para compuestos indólicos (29).

El monitoreo de radiactividad aplicada directamente al HPLC, permite la detección de compuestos radiactivos cuando eluyen de la columna. El detector más utilizado, es el de cuarzo sililante en cápsula. Este sistema se usa principalmente para estudiar el metabolismo de los fitorreguladores (29).

IV. METODOS DE EXTRACCION DE CITOCININAS.

Se han reportado varios métodos de extracción de citocininas, algunos de los cuales han sido desarrollados por Bielecki (49, 50); por Laloue y sus colaboradores (51); por Burrows y sus colaboradores (52); Tegelman (53); Dauphin y sus colaboradores (54); y por Nishinari y Syono (55).

Dauphin y sus colaboradores (54), extrajeron las citocininas de Mercurialis ambigua. 150-200 gramos de tejido fresco, se pusieron en nitrógeno líquido y se homogenizaron con agitación vigorosa. Posteriormente, se extrajo con etanol al 80 % tres veces. El extracto así obtenido se concentró al vacío para purificarlo posteriormente. El residuo obtenido se pasó a una columna SP Sephadex C 25, eluyendo con hidróxido de amonio 0.05 M. El extracto contiene nucleósidos, bases libres y nucleótidos. Los nucleósidos y bases libres se separan de los nucleótidos, extrayendo con n-Butanol saturado con agua. Posteriormente se concentra esta fase butanólica y las citocininas así obtenidas se disuelven en etanol al 35 %, y se eluyen a través de una columna Sephadex LH-20 con etanol al 35 %.

Las fracciones eluidas se compararon con estándares para saber a qué correspondían y las fracciones correspondientes a las citocininas se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Burrows y sus colaboradores (52), extraen las citocininas del t-RNA de germen de trigo. A 2.16 gramos de t-RNA de germen de trigo se añadió agua destilada y ésta solución se dejó a 4°C por 48 horas. Posteriormente, la mezcla se hidrolizó enzimáticamente con fosfatasa alcalina y veneno de víbora. El hidrolizado se extrajo seis veces con la fase superior de acetato de etilo-agua 5:1. El extracto así obtenido se liofilizó y el material sólido se disolvió en 4 ml. de etanol al 35 %, para posteriormente pasarse sobre una columna de Sephadex LH-20, eluyendo con el mismo disolvente. A cada una de las fracciones eluidas de la columna, se le determinó su absorbancia a 265 nm. Las fracciones que absorbían a esa longitud de onda, se les pasó por cromatografía en papel, eluyendo con etanol al 95 %. Los eluidos se concentraron a sequedad y se analizaron por bioensayo.

Nishinari y Syono (55), obtienen las citocininas a partir de cultivos de callo de tabaco. Las células colectadas

por filtración se homogenizan con etanol al 80 % en un mortero enfriado. El homogenizado se centrifuga a 10,000 x g por 20 min. Esta operación se repite dos veces. Todos los extractos etanólicos se concentran al vacío a 40°C. Posteriormente, la muestra se disuelve en agua destilada y se ajusta el pH a 3 con HCl 1.0 N y se extrae tres veces con hexano. La fase acuosa residual se ajusta a pH de 8.0 con hidróxido de sodio 1.0 N y se extrae tres veces con n-butanol saturado con agua. Todos los extractos de n-butanol se combinan y esto es lo que se conoce como la fase soluble en butanol. Esta fase se analiza por HPLC. A la fase acuosa residual se le añade fosfatasa alcalina con objeto de hidrolizar enzimáticamente a las citocininas conjugadas. Esta hidrólisis se lleva a cabo por espacio de 3 horas a 37° C. Después de este tratamiento, las citocininas se extraen tres veces con n-butanol saturado con agua, para posteriormente analizarse de la misma manera que las citocininas obtenidas de la fracción butanólica anterior.

Nishinari y Syono (52), indican en su artículo que con este método de extracción las citocininas libres se disuelven en el butanol, y las citocininas conjugadas permanecen en la

fase acuosa. La hidrólisis enzimática con fosfatasa alcalina, de las citocininas conjugadas presentes en la solución acuosa, libera a éstas, pudiendo entonces extraerse con n-Butanol.

P A R T E

EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL.

Los aparatos utilizados en éste trabajo fueron:

- Un cromatógrafo de líquidos Waters Assoc., RCM-100 equipado con: dos bombas de alta presión 6000-A; un inyector universal U-6-K; una columna radial Pak de Octadecilsilano, con tamaño de partícula de 5 micrometros y un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer, LC-55. Se tenía acoplado un banco de datos Sigma Perkin Elmer.

-Un cromatógrafo de gases Perkin Elmer, Mod. 3920, con detector de ionización a la flama. Columna capilar OV-101. Intervalo de temperaturas, 200 a 260°C, con una velocidad de calentamiento de 5° por minuto.

- Un espectrómetro de masas CG 59488 A. Columna Capilar de metilfenilsilicón de 25 m x 0.25 mm, programado de 200 a 260°C a 5°por minuto.

Todos los reactivos y disolventes utilizados, fueron grado R. A.; Q. P., y grado Espectro y se utilizaron sin previa purificación.

- Metanol, Merck.
- Etanol, Merck y Baker analyzed.
- n-Butanol, Monterrey.
- Hexano, Merck.
- Hidróxido de sodio JVC.
- Acido clorhídrico Adler.
- Zeatina, isómero trans, Sigma Chemical Co.
- Piridina.
- Hidróxido de potasio JVC.
- Trimetilclorosilano (TMCS) Aldrich.
- Hexametildisilazano (HMDS) Aldrich.
- Bis (trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) Aldrich

EXTRACCION.

Para poner a germinar las semillas de maíz, en un recipiente de vidrio se colocaron éstas semillas entre dos capas de algodón humedecido con agua destilada, y se cubrió el

recipiente con papel aluminio para evitar el paso de la luz. Las semillas se incubaron a 25°C durante 4, 24 y 48 horas, para proceder a su extracción.

Para extraer a las citocininas, a 10 gramos de granos de elote o semilla de maíz molida, se le añaden 30 mililitros de etanol al 80 % y se homogeniza con licuadora por espacio de 3 min., enfriando exteriormente con un baño de hielo-sal. Posteriormente, se centrifuga por espacio de 15 min, al término de los cuales se separan la fase sobrenadante y el residuo. A éste residuo, se le añaden otros 20 ml. de etanol al 80 % y se agita constantemente, durante 20 min., con agitador magnético en baño frío.

Esta mezcla se vuelve a centrifugar por 15 min, y el extracto sobrenadante se mezcla con el de la primera extracción y se concentran al vacío a 40°C y 25 mm. de Hg, hasta tener cerca de 10 ml.

El residuo así obtenido, se afora a 30 ml. de agua destilada y se ajusta el pH a 3 con HCl 1 N. Esta solución se lava con Hexano varias veces, con porciones de 10 ml. cada una, hasta que la fase orgánica quede transparente.

La fase acuosa se ajusta a pH de 8 con NaOH 1 N, y se

extrae con n-butanol saturado con agua, con tres porciones de 10 ml. cada una.

Los extractos de n-butanol se combinan y se evaporan a sequedad, a 5 mm. de Hg y 40°C en un evaporador rotatorio. El residuo se disuelve en 2 ml. de metanol y se filtra.

De la solución resultante, se toman 25 microlitros y se inyectan al cromatógrafo de líquidos, para analizar a las citocininas. Eluyente: mezcla metanol-agua 70:30; longitud de onda, 254 nm, velocidad de flujo 1.5 ml/min, velocidad de la carta, 5 mm/ min, atenuación, 3.

Para identificar a las citocininas por cromatografía de gases, el extracto obtenido de la fase butanólica se disuelve en aproximadamente 100 microlitros de piridina y se añaden 100 microlitros de hexametildisilazano y 10 microlitros de trimetilclorosilano (TMCS). La mezcla resultante se calienta a 60°C por espacio de 10 min. De los compuestos formados, se inyectan 5 microlitros al cromatógrafo de gases, que se adaptó a un espectrómetro de masas, del cual se obtiene un espectro de las señales registradas en dicho cromatógrafo.

RESULTADOS

Y

DISCUSION.

RESULTADOS Y DISCUSION.

De los métodos referidos en el capítulo anterior, se seleccionó el de Nishinari y Syono (55), por ser el que más fácilmente se adaptó al equipo y reactivos con los que se cuentan en el laboratorio, y también por ser un método rápido.

El método se adaptó a la extracción de citocininas en maíz, después de varios ensayos en que se optimizaron las condiciones, haciendo los siguientes cambios:

Dado que no se disponía de recursos para centrifugar a 4°C, ésta centrifugación se llevó a cabo a temperatura ambiente, no encontrándose variaciones en los resultados.

Durante la extracción con *n*-butanol saturado con agua, se observó que en algunas ocasiones se formaba un gel. Si los lavados con hexano no se limitaban a tres como indica el método original, sino que se hacían tantos lavados como fueran necesarios para que la fase orgánica quedara limpia, no se forma éste gel. Por ello se optó lavar con hexano las

veces necesarias.

Finalmente, el método de extracción quedó adaptado de la siguiente manera:

A 10 gramos de granos de elote o de semilla seca molida, se le añaden 30 ml. de etanol al 80% y se homogeniza con licuadora por espacio de 3 min, enfriando exteriormente con un baño de hielo-sal. Posteriormente, se centrifuga por espacio de 15 min. al término de los cuales se separan la fase sobrenadante y el residuo. A éste último, se le añaden otros 20 ml de etanol al 80% y se agita constantemente durante 20 min, con un agitador magnético en baño frío. Esta mezcla se vuelve a centrifugar por 15 min. y el extracto sobrenadante se mezcla con el de la primera extracción para concentrarse al vacío a 40°C y 25 mm. de Hg, hasta tener cerca de 10 ml.

El residuo así obtenido, se afora a 30 ml. con agua destilada y se ajusta el pH a 3 con HCl 1 N. Esta solución se lava con hexano varias veces, con porciones de 10 ml. cada una, eliminándose así compuestos neutros y ácidos solubles en éste disolvente.

La fase acuosa se ajusta entonces a pH 8 con NaOH 1 N.

y se extrae con n-Butanol saturado con agua con tres porciones de 10 ml. cada una.

Los extractos de n-Butanol se combinan y se evaporan a sequedad a 5 mm de Hg y 40°C en un evaporador rotatorio. El extracto obtenido de ésta manera se disuelve en 2 ml. de metanol y se filtra, para inyectar ésta solución al cromatógrafo de líquidos.

10 g. de muestra se homogenizan con 30 ml. de Etanol al 80% por 3 min.



Se centrifuga por 15 min y se disuelve el residuo en 20 ml. de etanol al 80 %.



El residuo se homogeniza con agitador magnético por 20 min, en frío.



Se centrifuga por 15 min.



Se concentran los extractos etanólicos a 40°C y 25 mm de mercurio.



Se afora con 30 ml. de agua destilada y se ajusta a pH de 3 con HCl 1 n.



Se extrae varias veces con hexano, con 10 ml. cada una.



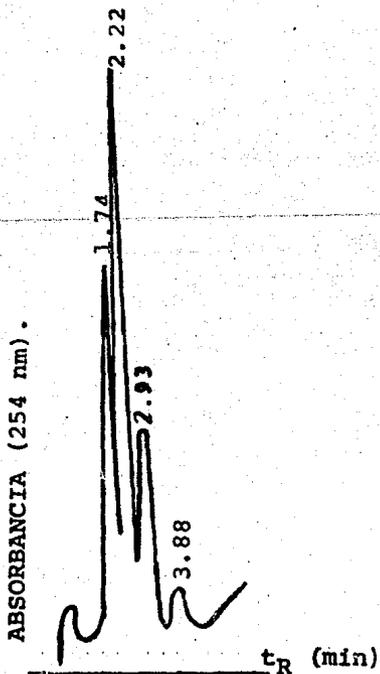
Se ajusta la fase acuosa a pH de 8 con NaOH 1 N y se extrae con n-Butanol tres veces con 10 ml. cada vez.



Se evaporan los extractos butanólicos a sequedad a 5 mm de Hg y 40°C.

ESQUEMA DEL METODO DE EXTRACCION.

En la Fig. 1, se muestra un cromatograma típico de un extracto de elote usando:



MUESTRA: Elote 9,98 gramos

Extracto 0,048 g.

Atenuación: 3

Mezcla de disolventes:

Metanol-agua 30-70

Vel. carta: 5 mm/ min.

Vel. flujo: 1.5 ml/min.

Sensibilidad: 500-50

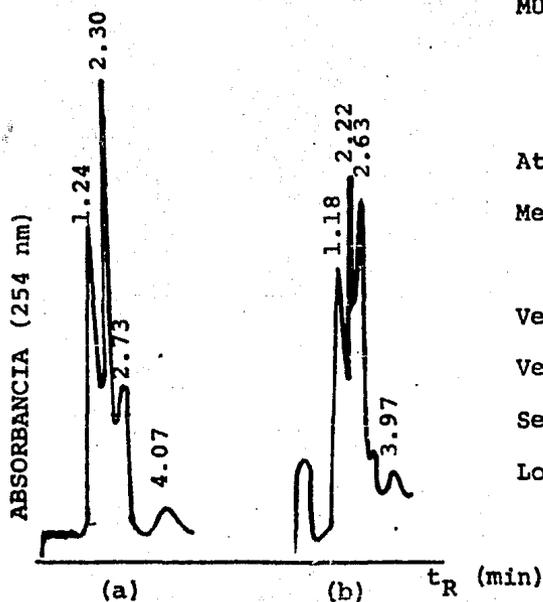
Longitud de onda: 254 nm.

Fig. 1.

Posteriormente, se procedió a enriquecer otro extracto de elote, obtenido de la misma forma, con un estándar de

zeatina con objeto de identificar cuál pico de los presentes en el cromatograma, corresponde a dicho compuesto.

En la Fig. 2, se presentan los resultados y en él se representa al extracto sin enriquecer en la Fig. 2a y al mismo extracto enriquecido con estándar de zeatina en la Fig. 2b.



MUESTRA: Elote: 10.09 g.

Extracto 0.065 g.

Zeatina. $2.36 \times 10^{-5} M$

Atenuación: 3

Mezcla de disolventes:

Metanol-agua 30-70.

Vel. carta: 5 mm/min.

Vel. flujo: 1.5 ml/min.

Sensibilidad: 500-50

Longitud de onda: 254 nm.

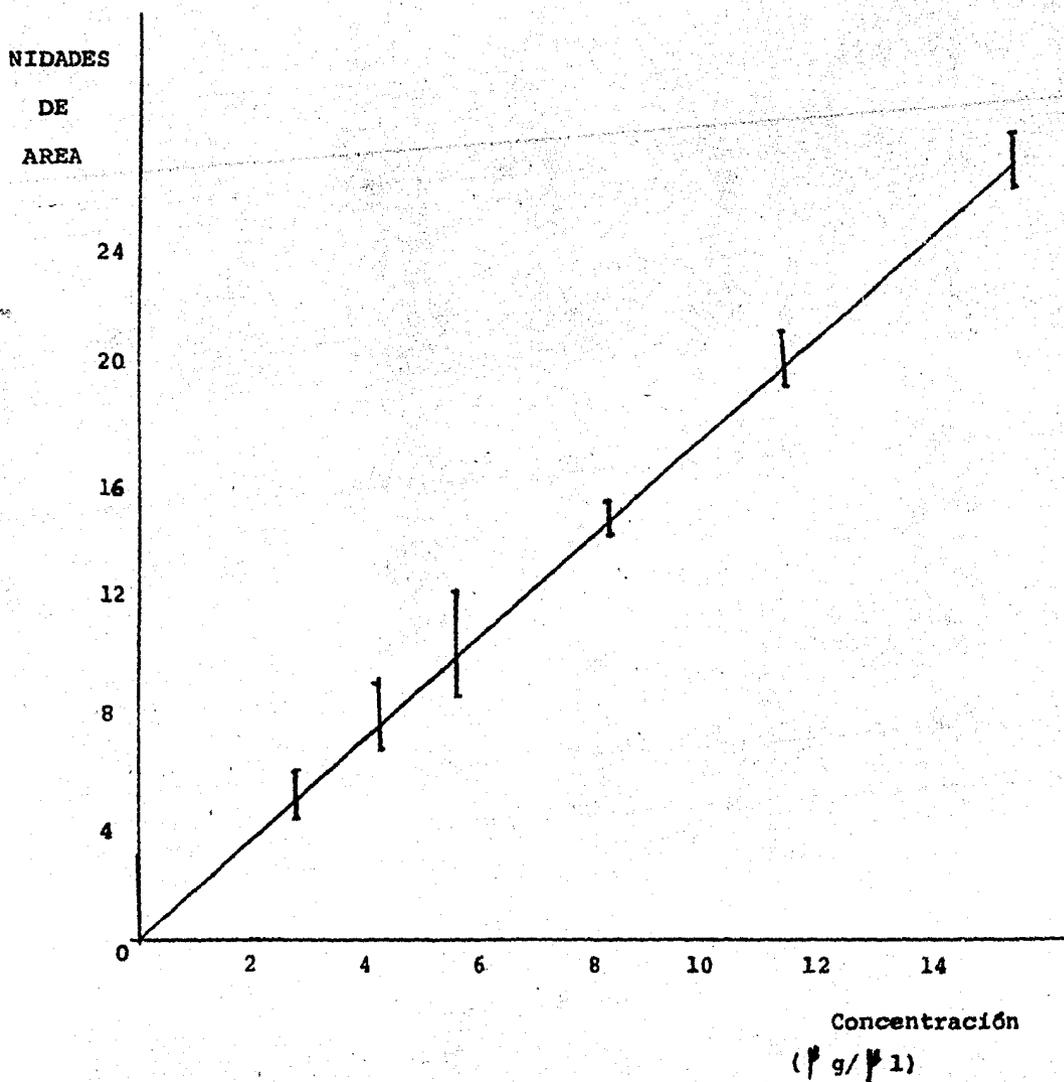
Fig. 2.

Se hicieron entonces extracciones de semillas de los genotipos de maíz H-139 y H-32, pero al introducir el extracto al cromatógrafo de líquidos, se presentaron problemas con la bomba de dicho aparato, lo que obligó a invertir la polaridad del eluyente, utilizándose entonces una mezcla de metanol-agua 70:30, que dió también buena separación, tanto en las muestras de elote como en las de maíz.

Con estas condiciones cromatográficas, se inyectó estándar de zeatina a distintas concentraciones, para tener una curva patrón en la que se relacionase el área del pico correspondiente a la zeatina y su concentración, para poder cuantificar a dicha zeatina presente en la muestra. En la gráfica correspondiente a la Fig. 3, se muestran los resultados obtenidos.

En los extractos de maíz H-139 y H-32, se encontró que la cantidad de citocininas presentes en 10 gramos de semilla seca, era mucho menor que la cantidad de citocininas encontradas en 10 gramos de elote, por lo que fue necesario hacer una extracción a partir de 40 gramos de semilla seca, dividida en dos lotes de 20 gramos cada uno. También se

CURVA PATRON CORRESPONDIENTE AL ESTANDAR
DE ZEATINA.



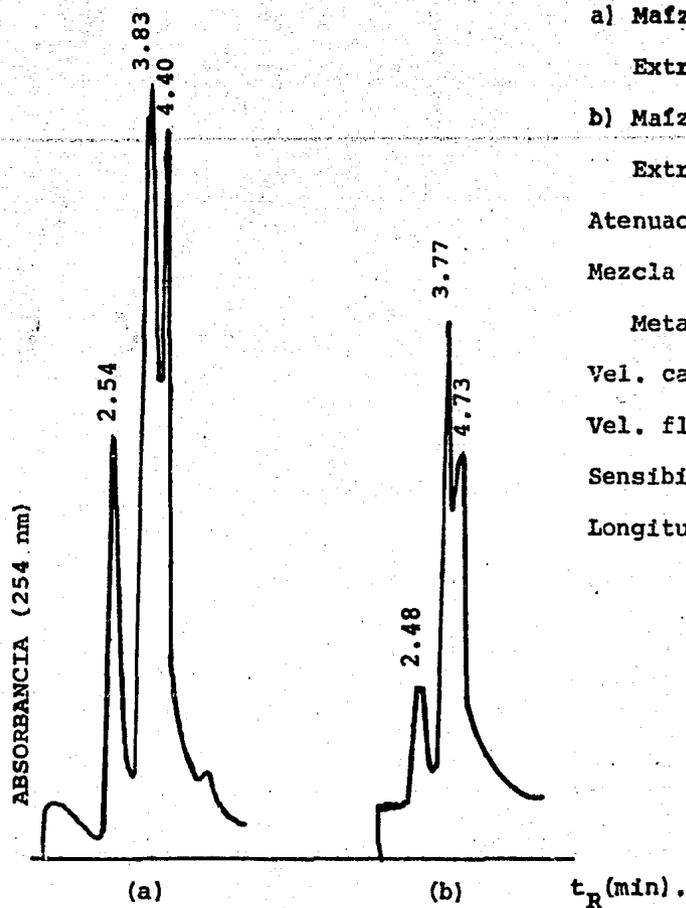
observó que el genotipo H-139 contiene una mayor cantidad de citocininas que el genotipo H-32.

En la Fig. 4a se presenta el cromatograma del extracto del genotipo de maíz H-139, y en la Fig. 4b, el correspondiente al genotipo H-32.

Dado que la cantidad de estándar de zeatina con la que se contaba, era muy pequeña, no fue posible enriquecer todos los extractos, por lo que la asignación se hizo muchas veces por comparación con muestras que sí habían sido enriquecidas con estándar (Figs. 2a y 2b).

NOTA: Los tiempos de retención varían un poco en los cromatogramas, ya que es muy difícil reproducir todas las condiciones necesarias para obtener los mismos tiempos de retención.

Una vez establecido el método de extracción y detección de las citocininas, se consideró importante determinar si las citocininas presentes en las semillas de maíz, se encontraban concentradas en alguna parte de la semilla, o si estaban distribuidas homogéneamente en ella. Para resolver esta cuestión, se separó manualmente el embrión del resto de la semilla, escogiendo en este caso al genotipo H-139.

**MUESTRA:**

a) Maíz H-139, 40.11 g.

Extracto: 0.045 g.

b) Maíz H-32, 40.10 g

Extracto: 0.033 g.

Atenuación: 3

Mezcla de disolventes:

Metanol- Agua 70:30

Vel. carta: 5 mm/min.

Vel. flujo: 1.5 ml/min.

Sensibilidad: 500:50

Longitud de onda: 254 nm.

Fig. 4.

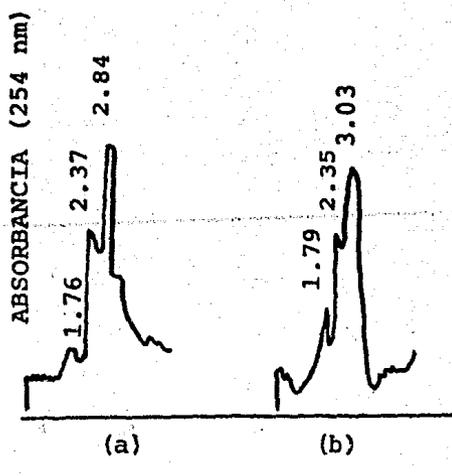
Se procedió entonces a hacer extracciones de los embriones obtenidos a partir de 20 gramos de semilla y paralelamente, extracciones de 20 gramos de semilla completa, para poder hacer una comparación.

La Fig. 5a, representa el cromatograma del extracto de semilla completa de H-139. El pico que aparece a un tiempo de retención de 3.03 min. se asignó a la zeatina por comparación con extractos anteriores, y como puede verse, representa aproximadamente el 60 % del extracto.

La Fig. 5b representa el cromatograma del extracto de los embriones obtenidos a partir de 20 gramos de semilla completa de H-139. El pico que aparece a 2.94 min, se asignó a la zeatina, y como puede verse, representa aproximadamente el 60% de este extracto.

Estos resultados permiten concluir que las citocininas están concentradas, en su inmensa mayoría en el embrión de la semilla, ya que el contenido encontrado en este embrión, es equivalente al encontrado en la semilla completa.

Una vez establecido que las citocininas se concentran en el embrión, y dado que éste consta de dos partes: eje embrionario y escutelo, es interesante determinar si las



Mismas condiciones
cromatográficas

t_R (min).

a) Muestra:

Semilla de maíz H-139
20 grámos

Extracto: 0.021 gramos

b) Muestra:

Embrión de semilla de
maíz H-139, lo relativo a
20 gramos.

Extracto: 0.022 gramos.

t_R	% Abundancia	t_R	% Abundancia
1.79	1.82	1.76	3.48
2.35	31.07	2.37	34.76
3.03	60.45	2.94	60.45

Fig. 5.

citocininas se concentran en una de dichas partes o se distribuyen en ambas.

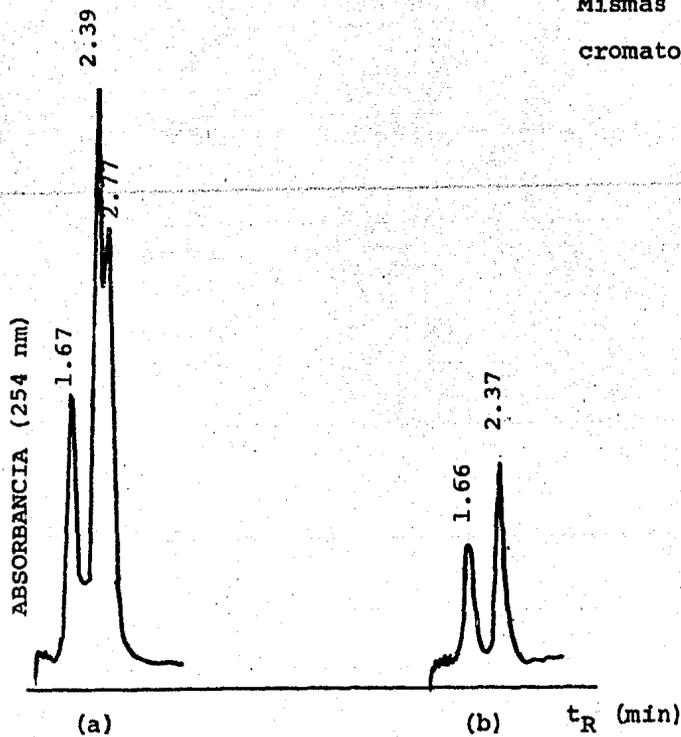
Con este propósito, se procedió a separar el eje embrionario y el escutelo de un lote de 40 gramos de semilla H-139 y se hicieron extracciones por separado de dichos componentes.

En la Fig. 6a, se muestra el cromatograma del extracto del eje embrionario. El pico con tiempo de retención de 2.77 min. se asignó a la zeatina, y se observa que éste pico representa el 33 % del extracto.

La Fig. 6b, representa el cromatograma del extracto de escutelo del mismo lote de semillas. Como puede observarse, en éste caso no está presente el pico que corresponde a la zeatina, lo que permite concluir que las citocininas se encuentran en el embrión y principalmente en el eje embrionario de éstas semillas.

Como ya se mencionó anteriormente, se tenía interés en medir las variaciones en los niveles de citocininas durante la germinación de semillas de maíz. Con este objetivo, se pusieron a germinar semillas de maíz H-139 en las siguientes condiciones:

Mismas condiciones
cromatográficas.



a) Muestra:

Eje embrionario.

b) Muestra:

Escutelo

Lo relativo a 40 gramos.

Extracto: 0.063 gramos

Extracto: 0.011 gramos

t_R	% Abundancia	t_R	% Abundancia
1.67	17.17	1.59	21.60
2.39	49.70	2.37	77.82
2.77	33.13		

Fig. 6.

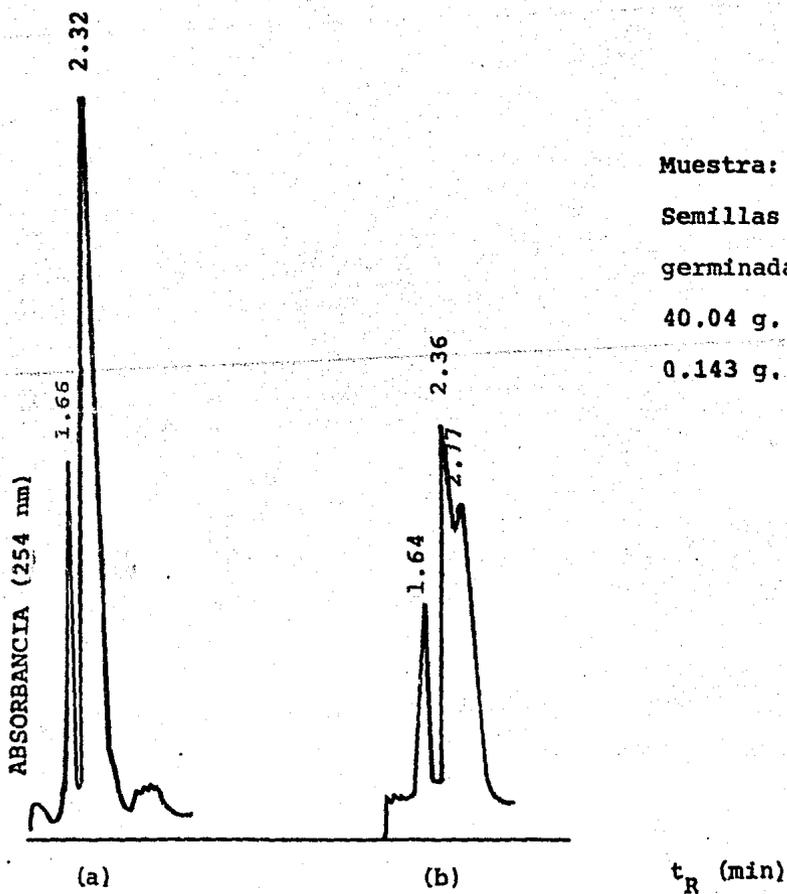
En un recipiente de vidrio, se colocaron las semillas entre dos capas de algodón humedecido con agua destilada, y se cubrió con papel aluminio para evitar el paso de la luz. Se incubó a 25°C durante 4,24 y 48 horas, para proceder a su extracción.

La Fig. 7a, muestra el cromatograma del extracto de semilla H-139 después de 24 horas de sometida a las condiciones de germinación, señaladas anteriormente. Como puede verse en el cromatograma, no se observa el pico con tiempo de retención alrededor de 3 min, correspondiente a la zeatina.

La Fig. 7b muestra el cromatograma del mismo extracto, de la Fig. 7a, sólo que enriquecido con estándar de zeatina. Como puede verse en éste cromatograma, sí aparece el pico con tiempo de retención de 2.77 min, correspondiente a la zeatina.

Estos resultados fueron muy desconcertantes, ya que se esperaba que durante la germinación se observara un incremento notable de citocininas y, sobre todo, de zeatina, ya que es una de las citocininas naturales más activas.

En un principio, se creyó que las semillas con las que



Muestra:

Semillas de maíz H-139

germinadas durante 24 h

40.04 g. semilla seca

0.143 g. extracto.

a) Extracto sin enriquecer.

b) Extracto enriquecido con zeatina (0.25 mg/ml).

Fig. 7.

se trabajó, estaban envejecidas y por eso se tenían estos resultados no esperados. Se intentó entonces obtener semillas de éstos genotipos más frescas pero no fue posible, por lo que se optó por cambiar el genotipo a maíz chalqueño, que era más fresco que los genotipos con los que se había trabajado hasta ahora. Sin embargo, al hacer la extracción con éstas semillas de maíz chalqueño, los resultados fueron los mismos: aparecen dos picos y al enriquecerse el extracto con estándar de zeatina, aparece un tercer pico, lo que indica que en el extracto de maíz no hay zeatina.

Entonces, se revisaron cuidadosamente todos y cada uno de los pasos seguidos durante la extracción y lo mismo se hizo con los disolventes y reactivos usados, no encontrándose fuentes de error en éstos puntos.

Por ésta razón, se revisó nuevamente la literatura en lo referente a métodos de extracción, y se encontró un método reportado por Vizárová y Vozar (56), muy semejante al de Nishinari y Syono (55), que es el que se había seguido.

Las únicas diferencias entre ambos métodos, eran que Vizárová utilizó éter etílico en lugar de hexano para lavar

los extractos de la solución ácida, y extraer los compuestos neutros y ácidos. La otra diferencia consistió en que se emplea hidróxido de amonio 0.1 M, para alcalinizar la solución acuosa antes de la extracción con n-Butanol.

Como se vé, las modificaciones eran mínimas, por lo que no se pensó que la fuente de error estuviera en el método de extracción, aunque se compararon ambos métodos y no se encontraron diferencias apreciables en los resultados.

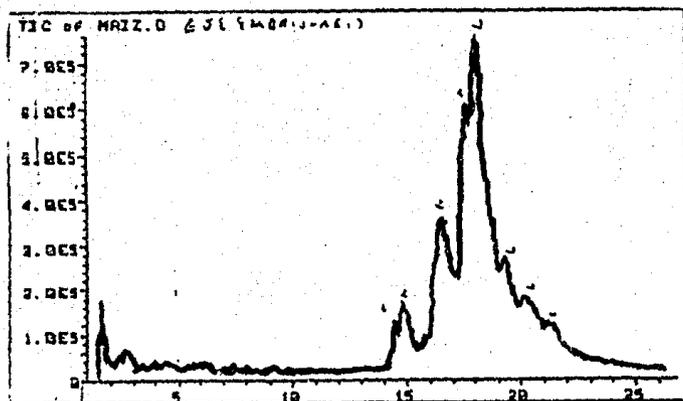
En el momento en que el trabajo se encontraba en éste punto, quedó instalado en la División de Estudios de Posgrado, un espectrómetro de masas acoplado a un cromatógrafo de gases.

Como en la literatura se reportan identificaciones de citocininas por cromatografía de gases-espectrometría de masas (40, 58, 59, 60), se trató de identificar a dichos compuestos por éste método.

Para ello, de un extracto correspondiente a los ejes embrionarios obtenidos a partir de 200 gramos de semilla seca del genotipo de maíz Chalqueño, se formaron derivados trimetilsililados de la siguiente manera: El extracto obtenido se disolvió aproximadamente en 100 microlitros de

hexametildisilazano (HMDS) y 10 microlitros de trimetilclorosilano (TMCS). La mezcla formada se calentó a 60°C durante un período de 10 a 15 min.

Los derivados así formados se inyectaron al cromatógrafo de gases, acoplado al espectrómetro de masas, obteniéndose los siguientes resultados:



Cromatograma del derivado trimetilsililado.
Muestra: Eje embrionario de maíz chalqueño,
Lo relativo a 200 gramos.

Fig. 8.

En el cromatograma presentado en la Fig. 8, se observan 8 picos, de los cuales se obtuvieron los espectros de masa de los tres picos que están en mayor proporción (Figs. 9, 10 y 11).

Los pesos de las citocininas libres trimetilsililadas van de 350 a 440 y los pesos de las citocininas conjugadas sililadas, van de 480 a más de 600 unidades de masa.

Como se creyó que las citocininas que se obtenían por éste método eran las libres, se programó el aparato para determinar espectros de masas de compuestos con pesos inferiores a 500 unidades de masa.

El espectro mostrado en la Fig. 10, parece corresponder a la zeatina trimetilsililada, tanto por el peso del fragmento de masa mayor, como por los demás fragmentos formados (60).

En los espectros de las Figuras 9 y 11, se observa que el fragmento con masa mayor es superior al esperado para las citocininas trimetilsililadas. No obstante, no se tiene la certeza de que el peso registrado corresponda al ión molecular o a un ión fragmento, porque como se mencionó, el peso máximo que se podía registrar era de 500

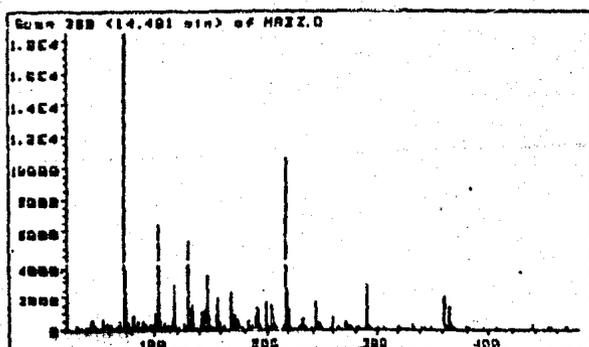
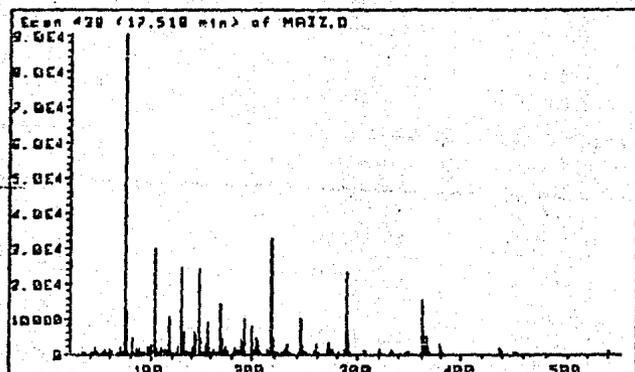


Fig. 9

Espectro de masas del tercer pico del cromatograma.
Scan 350 (14.401 min) of MAIZ.O
EJE EMBRIONARIO

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
30.75	1	97.95	1	150.15	1	215.15	1
32.00	1	99.05	1	151.00	1	217.15	57
41.00	1	99.95	1	155.15	4	218.15	13
43.00	2	101.05	5	156.15	1	219.15	6
44.00	1	101.95	1	157.00	10	220.25	1
45.00	3	103.05	34	158.00	3	230.25	1
46.90	1	104.05	3	159.00	2	231.15	3
53.20	1	105.05	3	163.00	1	233.15	1
54.95	3	109.05	2	169.00	12	243.25	8
56.80	1	110.95	1	170.15	2	244.15	2
58.20	1	112.95	1	171.15	4	245.20	2
58.95	2	115.05	1	173.15	3	247.20	1
59.00	1	116.05	3	175.00	1	248.05	1
61.05	1	117.05	15	177.15	1	259.20	3
67.30	1	118.05	1	183.15	2	260.05	1
69.05	3	119.05	1	185.00	1	271.05	2
73.05	100	127.05	2	187.00	1	273.20	1
74.05	8	129.05	28	189.15	4	275.05	1
75.05	21	130.20	4	190.00	1	289.20	15
76.05	1	131.05	6	191.15	6	290.20	3
77.05	2	132.20	2	192.15	1	291.05	1
81.05	4	133.05	7	193.25	1	332.30	1
82.05	1	134.20	1	199.15	9	361.25	11
83.30	1	141.20	1	200.15	2	362.15	3
85.05	3	142.05	4	201.15	1	363.25	1
89.05	3	143.05	5	203.15	1	365.25	7
91.05	1	144.20	1	204.15	7	366.25	2
92.95	1	145.20	6	205.15	3	367.25	1
95.05	1	147.15	19	206.25	1	437.40	1
95.95	1	148.15	3	207.00	1	451.20	1
97.05	1	149.00	4				



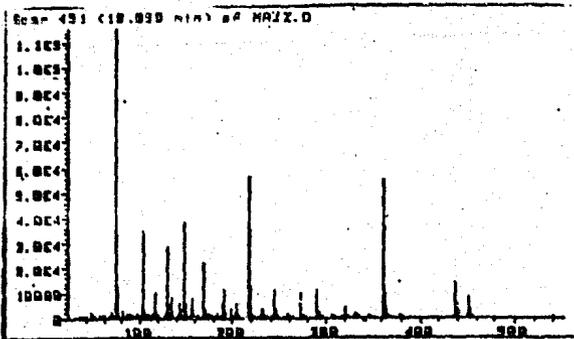
Scan 438 (17.518 min) of MAIZ.D

EJE EMBRIONARIO

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
45.00	1	129.05	27	175.15	1	245.05	2
54.95	1	130.20	3	183.15	2	247.05	1
58.95	1	131.05	6	185.15	1	259.05	2
68.95	2	132.20	1	189.15	4	271.20	3
73.05	100	133.05	6	191.15	11	272.05	1
74.05	8	134.05	1	192.15	1	273.05	1
75.05	14	141.05	1	199.15	8	275.20	1
76.95	1	142.20	2	200.15	1	288.20	1
81.05	4	143.05	6	203.00	1	289.20	25
85.05	2	144.05	1	204.15	5	290.20	6
89.05	1	145.20	5	205.15	3	291.20	2
97.05	2	147.15	26	207.15	1	319.20	1
101.05	2	148.15	4	215.15	1	332.20	1
103.05	33	149.00	4	217.15	35	361.25	16
104.05	3	155.00	3	218.15	8	362.25	5
105.05	1	157.00	10	219.15	4	363.25	3
109.05	1	158.15	2	221.15	1	364.25	1
113.05	1	159.15	1	229.15	1	365.15	5
115.05	1	163.15	1	230.15	1	366.25	1
116.20	1	169.15	16	231.15	2	378.25	1
117.05	12	170.15	2	233.15	1	379.25	2
118.05	1	171.15	4	243.15	10	380.25	1
119.05	1	173.15	2	244.15	2	437.25	1
127.05	2						

Espectro de masas del cuarto pico del cromatograma.

Fig. 10



Scan 451 (18.059 min) of MAIZ.D
EJE EMBRIONARIO

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
45.00	2	130.05	3	192.15	1	272.05	2
54.95	1	131.05	4	199.15	3	273.20	1
68.95	2	133.05	7	203.15	1	289.20	9
73.05	100	142.05	1	204.15	5	290.20	2
74.05	8	143.05	4	205.15	3	291.20	1
75.05	10	145.05	3	206.15	1	305.20	1
81.05	2	147.00	33	207.15	1	319.20	3
85.05	1	148.15	4	215.15	1	320.20	1
88.95	1	149.00	4	217.15	48	331.20	1
97.05	1	155.15	2	218.15	10	361.15	47
101.05	2	157.00	6	219.15	4	362.25	15
103.05	30	158.15	1	221.15	1	363.25	8
104.05	2	159.00	1	229.15	2	364.25	1
105.05	1	163.15	1	230.15	2	365.15	2
109.05	1	169.15	19	231.15	2	379.25	1
113.05	1	170.15	2	243.15	9	437.25	11
115.05	1	171.15	2	244.15	2	438.40	4
116.05	1	173.15	1	245.05	2	439.30	2
117.05	8	183.00	1	247.20	1	450.30	1
119.05	1	189.15	4	257.20	1	451.30	6
127.05	2	190.15	1	259.20	1	452.30	3
129.05	24	191.15	9	271.05	8	453.30	1

Espectro de masas del quinto pico del cromatograma,

Fig. 11.

unidades de masa, ya que los fragmentos en éstos espectros son característicos de las citocininas (60).

Dado que no se tuvo la certeza de que se tenían los iones moleculares y que aparentemente habían fragmentos más pesados que los esperados, se pensó en la posibilidad de que en el extracto obtenido no sólo se tuvieran las citocininas libres, sino también algunas asociadas a un azúcar.

Para aclarar éste punto, se repitió el experimento, programando el instrumento ahora para que registre iones con masas superiores a 500 unidades.

Sin embargo, algunos contratiempos surgidos con el aparato, hicieron que las muestras se analizaran varias horas después de haber hecho los derivados y los espectros obtenidos muestran algunas diferencias con los obtenidos anteriormente.

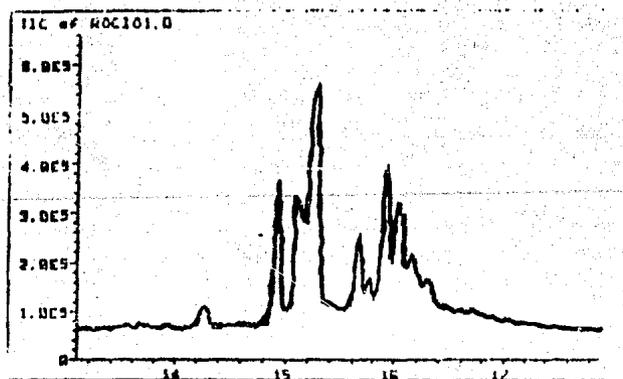
En la Fig. 13 se muestra un espectro de masas con una fracción molecular de 361 y parece corresponder a la zeatina dimetilsililada, lo que significaría una fácil descomposición del derivado trimetilsililado.

Como se mencionó anteriormente, la muestra no se analizó inmediatamente después de formar el derivado y en el

cromatograma, se observan muchos más picos que la vez anterior (Fig. 12), lo que podría indicar que la muestra se descompone muy fácilmente.

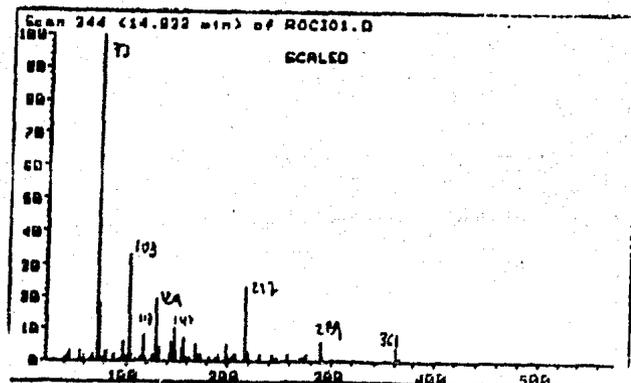
Este experimento no se pudo repetir para aclarar las dudas surgidas, pero todo parece indicar que por el método de extracción seguido no sólo se obtienen las citocininas libres, sino también las conjugadas. Esto explicaría en parte los resultados obtenidos por cromatografía de líquidos, ya que dependiendo si se extraían las citocininas conjugadas o libres, podía o no aparecer el pico correspondiente a la zeatina libre.

Sin embargo, es necesario aclarar éste punto, y en dado caso de que se obtenga una mezcla de citocininas libres y conjugadas, una alternativa podría ser la hidrólisis de éstos compuestos y poder determinar su contenido en la semilla.



Cromatograma del derivado trimetilsililado,
 Muestra: Maíz Chalqueño., eje embrionario,
 lo relativo a 200 gramos,
 Extracto: 0.024 gramos.

Fig. 12



Espectro de masas de un pico obtenido en el cromatograma

Fig. 13

RESUMEN

Y

CONCLUSIONES

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1. Se hizo una amplia revisión de los métodos de extracción y cuantificación de citocininas que se encuentran reportados en la literatura.
2. Se adaptó el Método de Nishinari y Syono (55) para la extracción de citocininas presentes en elote y en semillas de maíz.
3. Se determinaron las condiciones para la identificación y cuantificación de la zeatina presente en la mezcla de citocininas extraída en semillas de maíz, utilizando la técnica de cromatografía de líquidos (HPLC).
4. En el genotipo de maíz H-139 se encontró que las citocininas se concentran en el embrión y dentro de éste, aparentemente la mayoría de dichas citocininas se encuentran en el eje embrionario.
5. Usando la técnica de Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas, se llegó a la conclusión de que con el método empleado se extraen en el butanol tanto las

citocininas libres como las asociadas a azúcares, no obstante que Nishinari y Syono (55) reportan que con éste método sólo se extraen las citocininas libres.

6. Se intentó cuantificar la variación de los niveles de citocininas durante el proceso de la germinación, pero no fue posible debido a los resultados contradictorios obtenidos por cromatografía de líquidos, derivados del hecho de que durante la extracción se obtienen también las citocininas conjugadas.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA.

1. Hill, Thomas A. Endogenous Plant Growth Substances. The Institute of Biology's Studies in Biology, No. 40, Edward Arnold (Publishers) 1973.
2. Wareina, P. F. & Phillips, I. D. J. The control of Growth and development. Mc. Graw Hill. N. York, Toronto, Sydney, México, Johannesburg & Panamá (1969).
3. Gran Enciclopedia Rialp GER. Tomo X. Ed. Rialp. S. A. Madrid, 1979, p. 860-62.
4. Mayer, A. M. & Boljakoff-Mayber. The germination of seeds. 2nd. Ed. Pergamon Press (1977).
5. Bewley, J. D. & Black, M. Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination. V. I. Springer-Verlag (1978).
6. Bewley, J. D. & Black, M. Physiology and Biochemistry of seeds in Relation to Germination. V. II. Springer-Verlag (1982).
7. Schneider, E. A. Ann. Rev. of Plant Physiol. 25:483-513

(1974).

8. Cohen, J. D. & Bardurski, R. S. Ann. Rev. Of Plant Physiol. 33:403-30 (1982).
9. Davis, Gregory C., et. al. Analytical Chemistry. 57: 638-48 (1985).
10. Wilkins, M. B. Physiology of plant Growth & Development. Mc. Graw Hill. London. Pags. 605-46 (1969).
11. Wittwer, S. H. Ann. Agron. 23 (4): 445-59 (1972).
12. Thiman, M. V. Plant Physiol. 54:450-54 (1974).
13. Leopold, A. C. Plant Growth and Development. Mc. graw Hill. New York, San Francisco, Toronto & London (1964).
14. Goleniowski, M. E. Edytion. 34 (2): 169-77 (1976).
15. Goeschl, J. D., et. al. Pl. Physiol. Lancaster. 41: 877;85 (1966).
16. Haberlandt, G. Biol.Zentr. 42:145 (1922).
17. Skoog, F., et. al. Phytochemistry. 6: 1169 (1967).
18. Miller, C. O. Ann. Rev. Plant Physiol. 12:395 (1961).
19. Letham, D. S. Regulateurs Naturels de la Croissance Vegetale; Paris; Edition du Centre National de la Recherche Scientifique (1964).
20. Skoog, F. & Strong, F. M. Science 148:532-33 (1965).

21. Sánchez y García Figueroa, Fca. Leonora. Citocininas, Relaciones de estructura-actividad. Tesis. UNAM. (1975).
22. Fox, J. E. The Cytokinins. In the Physiology of Plant Growth and development. Mc. Graw Hill. N. York, Toronto, Sydney, Mexico, Johannesburg & Panama (1969).
23. Das, N. L., et. al. Physiol. Plant. 9:640-51 (1956).
24. Guttman, R. Chromosoma. 8:341-50 (1956).
25. Miller, C. O. & Skoog, F. Amner. J. Bot. 51:618 (1953).
26. Richmond, A. E. & Lang, A. science. 125:650 (1957).
27. Koshimizu, K., et. al. Agric. Biol. Chem. 32:789-91 (1968).
28. Cavé, A. Bull. Soc. Chim. France. 869: (1959).
29. Brenner, Mark L. Ann. Rev. Plant Physiol. 32:511-38 (1981).
30. Horgan, R. Progress in Phytochemistry. 137-70 (1978-79)
31. Horgan, R. Analytical procedures for Cytokinins. Cambridge: Cambridge Univ. Press. Pags. 97-113. (1978).
32. Biddington, N. L. & Thomas, T. H. J. Chromatoqr. 75: 122-23 (1973).
33. Glenn, J. L., et. al. Phytochemistry. 11:345-51 (1972).
34. Armstrong, D. J., et. al. Biochem. Biophys. Acta. 37:

451 (1969).

35. MacMilla, J. & Wells, C. M. J. Chromatogr. 87:271-76 (1973).
36. Engulg, K. C., et. al. Physiol. Plant. 42:365-68 (1978).
37. Mc. Dougall, J. & Hillman, J. R. J. Exp. Bot. 29: 375-86 (1978).
38. Ehmman, A. Carbohydr. Res. 34:99-114 (1974).
39. Vreman, H. J. & Corse, J. Physiol. Plant. 35:33-6 (1975).
40. Durley, R. C. & Pharis, R. P. Phytochem. 11:317-26 (1972).
41. Koyama, S., et. al. Agric. Biol. Chem. 42:1997-2001 (1978)
42. Pengelly, W. & Meins, F. Jr. Planta. 136:173-80 (1977).
43. Walton, D. C., et. al. Planta. 146:139-45 (1979).
44. Zelleke, A, et. al. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 105: 50-53 (1980).
45. Martin, G.C., et. al. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 105: 46-50 (1980).
46. Horgan, R. & Kramers, M. R. J. CHromatogr. 173:263-70 (1979).
47. Belke, C. J. Plant Physiol. 65:94 (suppl) (1980.
48. Morris, R. O. Anal. Lett. 11:73-83 (1978).
49. Bielecki, R. L. Plant Physiol. 43:1297-1308 (1968).

50. Bielecki, R. L. Anal. Biochem. 9:431-42 (1964).
51. Laloue, M., et. al. FEBS Letters. 46:45-9 (1974).
52. Burrows, W. J. et. al. Biochemistry. 9 (9):1967-72 (1970).
53. Tegelman, A. J. Plant Science Letters. 14:259-62 (1979).
54. Dauphin, B., et. al. Planta. 144:113-19 (1979).
55. Nishinari, N. & Syono, K. Plant & Cell. Physiol. 21: (3) 383-93 (1980).
56. Vizárová, G. & Vozar, I. Biochem. Physiol. Pflanz. 979:767-74 (1984).
57. Hahn, H. Physiol. Plant. 34:204-207 (1975).
58. Kaiss-Chapman, R. W. & Morris, R. O. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76:453059 (1977).
59. MacLeod, J. K., et. al. J. Org. Chem. 41:3959-77 (1976)
60. Young, H. Anal. Biochem. 19:220;33 (1977).