

00381
6
201



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CATABOLISMO DEL ALMIDON DURANTE EL
DESARROLLO DE LA SEMILLA DE
(pompa purpurea (L)), ARVENSE DEL MAIZ**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)**

P R E S E N T A :

M. EN C. DAVID MANUEL DIAZ PONTONES

MEXICO, D. F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

INDICE DE TABLAS

		página
TABLA I-	Regresión y análisis de varianza de la transformación entre el peso fresco y el tiempo de desarrollo	50
TABLA II-	Comparación de la actividad amilolítica medida a dos pH	72
TABLA III-	Proporción de la actividad amilolítica en diferentes pH	73
TABLA IV-	Actividad de la fosforilasa del almidón en semillas en desarrollo	74

5g	Localización de proteínas en una zona del parénquima del tegumento de una semilla de 15 días de desarrollo	57
5h	Localización del almidón dentro del parénquima del tegumento de una semilla de 15 días de desarrollo	57
5i	Cuerpo del embrión a los 15 días de desarrollo	58
5j	Cotiledón y parénquima del tegumento a los 15 días de desarrollo	58
5k	Cotiledón y parénquima del tegumento a los 28 días de desarrollo	59
6a	Cantidad de almidón durante el tiempo transcurrido en el desarrollo de la semilla de <i>Ipomoea purpurea</i>	61
6b	Cambios en la cantidad de almidón con respecto al incremento de peso fresco durante el desarrollo de la semilla de <i>Ipomoea purpurea</i>	61
6c	Suavización en base en el tiempo	62
6d	Suavización en base en el peso fresco	62
6e	Cambios en la relación almidón/peso fresco durante el desarrollo de la semilla	63
6f	Suavización de la relación almidón/peso fresco durante el desarrollo de la semilla	63
7	Espectros de absorción de las muestras extraídas durante el desarrollo de la semilla de <i>Ipomoea purpurea</i>	66
8	Actividad amilolítica obtenida durante el desarrollo de la semilla	68

INDICE DE FIGURAS

	Página
1a Diagrama del método de extracción de los granos de almidón	28
1b Diagrama del método de cuantificación del almidón	31
2 Efecto del tratamiento del almidón de papa con diferentes solventes	38
3a Efecto de la concentración creciente de yodo en la formación del complejo almidón-yodo	40
3b Transformación por doble recíproca del efecto de la concentración del yodo en la formación del complejo almidón-yodo	41
3c Relación lineal entre la absorbancia máxima para diferentes cantidades de almidón	42
3d Gráfica de saturación vs la cantidad de I ₂ -KI agregado	43
3e Transformación por doble recíproca de la saturación vs la cantidad de I ₂ -KI agregado	44
3f Gráfica del inverso de la cantidad de yodo vs el inverso de la cantidad de almidón para obtener una saturación del 85 % o el 90 %	45
4a Cambios en el peso fresco de las semillas durante el desarrollo	48
4b Transformación del incremento del peso fresco durante el desarrollo de la semilla	49
5a Estado de desarrollo de la semilla a las 48 horas después de la antesis	53
5b Embrión de 10 días de desarrollo	54
5c Embrión de 10 días de desarrollo teñido con lugol	54
5d Región del parénquima del tegumento de una semilla de 13 días de desarrollo: proteínas	55
5e Región del parénquima del tegumento de una semilla de 13 días: almidón	55
5f Corte de una semilla en desarrollo a los 15 días	56

para saturar al almidón	39
C- Desarrollo de la semilla y la localización del almidón	46
D- Cantidad de almidón durante el desarrollo de la semilla	60
E- Espectros de absorción del almidón	65
F- Actividad amilolítica durante el desarrollo	67
G- Determinación de la actividad fosforolítica durante el desarrollo de la semilla	70
VI- Discusión	75
VII- Conclusiones	82
VIII-Bibliografía	84

INDICE GENERAL

	página
Indice General	-6
Indice de Figuras	-4
Indice de Tablas	-2
Abreviaturas	-1
I- Resumen	1
II- Antecedentes	
A- Plantas arvenses	3
B- El género <i>Ipomoea</i>	5
C- Desarrollo embrionario	8
D- Sustancias de reserva en las semillas	13
E- Vías del catabolismo	17
F- Movilización de carbohidratos durante el desarrollo de la semilla	21
III- Objetivos	28
IV- Materiales y Métodos	
A- Material biológico	27
B- Aislamiento de los granos de almidón	27
C- Extracción de lípidos de granos de almidón	29
D- Cantidad de I ₂ -KI requerida para saturar al almidón	30
E- Cuantificación del almidón	32
F- Análisis histológico	32
G- Extracto enzimático	33
H- Cuantificación de la actividad amilolítica	34
I- Cuantificación de la actividad fosforolítica	34
J- Cuantificación de la cantidad de proteína	35
K- Análisis de los datos	35
V- Resultados	
A- Establecimiento de la técnica de extracción del almidón	37
B- Determinación de la cantidad de I ₂ -KI requerida	

ABRVIATURAS.

A= almidón.
C= cotiledón.
CE= cuerpo del embrión
E= embrión.
EE= eje embrionario.
En= endospermo
Ep= epicótilo
Hv= has vascular.
L= laticífero
Po= procambium
PE= proembrión.
Pov= pared del ovario.
Pr= proteína
PT= parénquima del tegumento.
S= suspensor.
Sa= saco embrionario
T= testa
To= capas de la testa sin incluir el parénquima del tegumento.

I- RESUMEN

Ipomoea purpurea es una arvense que infesta los cultivos de importancia para el hombre, como es el maíz y el frijol. Esta arvense posee mecanismos adaptativos que le permiten desplazar al cultivo al cual infesta. Se ha observado que esta especie produce una gran cantidad de semillas viables, que poseen una rápida germinación y establecimiento. Estas características se encuentran íntimamente relacionadas con los eventos que ocurren durante el desarrollo de la semilla, en los que se debe de tomar en cuenta la utilización y/o movilización de los diversos carbohidratos. Por lo anterior el objetivo del presente trabajo es el de localizar y cuantificar la cantidad de almidón, así como la presencia de actividad amilolítica y de la fosforilasa del almidón durante el desarrollo de la semilla de *Ipomoea purpurea*, desde la antesis hasta la semilla madura hidratada. Los resultados obtenidos demuestran que este polisacárido se encuentra localizado tanto en la pared del ovario como en el parénquima del tegumento para las primeras etapas del desarrollo. Posteriormente se detecta almidón dentro de la semilla únicamente en el parénquima del tegumento. La cantidad de almidón durante el desarrollo demuestran que inicialmente se acumula hasta llegar a un máximo entre los 17 a 19 días postantesis. Conforme prosigue el desarrollo de la semilla, se observa un decremento en la cantidad de este polisacárido, coincidiendo con la expansión de los cotiledones. Durante el decremento en la cantidad de almidón se observa un incremento en la actividad amilolítica y fosforolítica. El consumo de este carbohidrato dentro del parénquima del tegumento se realiza de los estratos más internos hacia los más externos durante el desarrollo de la semilla. Lo cual demuestra que el almidón es una sustancia de reserva temporal, que se encuentra en el parénquima del tegumento, a diferencia de las leguminosas que lo acumulan temporalmente en la pared del fruto, o en forma definitiva en los cotiledones. La presencia del almidón en el parénquima del tegumento, puede significar una ventaja a estas semillas, puesto que les puede proporcionar una independencia temprana de la planta materna.

Por otra parte esta reserva asegura que el desarrollo de la semilla llegue a buen termino.

II- ANTECEDENTES.

A- LAS PLANTAS ARVENSIS.

Una planta arvense segun Eaton y MacLeod (1948) es aquella que afecta el crecimiento del cultivo al cual está dedicado el terreno. Estos daños se reflejan en las bajas considerables que ocasionan en el rendimiento de los cultivos. Los daños indirectos son causados en primer lugar, por la competencia que se establece entre el cultivo y la maleza por los factores que favorecen el crecimiento, como el agua, luz y nutrientes entre otros; en segundo lugar por la secreción de fitotoxinas y en tercero por que algunas especies son parásitas. En cuanto a los daños indirectos que producen las malezas se encuentran: el de hospedar a una amplia gama de plagas agrícolas como son los roedores o diversos insectos. Todos estos factores reducen la productividad agrícola, lo que ocasiona un aumento notable de los costos de operación en las cosechas (Muenaher, 1955; King, 1966; Agundis 1964).

La capacidad de las diversas arvenses para sobrevivir a medios hostiles, se debe a su alto grado de especialización. Su ciclo de vida, morfología y mecanismos reproductivos, le proporcionan ciertas ventajas adaptativas que le permiten desplazar a los cultivos a los cuales infesta

Un principio de la competencia entre dos especies, consiste en que una planta que primero se establezca u ocupe un área, tiene ciertas ventajas sobre las que germinen después. La alta producción de semillas, su alta viabilidad, la rápida germinación y pronto establecimiento de las plántulas, son algunos factores que favorecen a las arvenses en su competencia con las plantas cultivadas. El éxito en el establecimiento de la plántula, se ve influenciado por el tamaño de los cotiledones, el índice de

producción de hojas y el área foliar que son las que permiten establecer una alta tasa de fotosíntesis, aunado a que éstas producen sombra, interfiriendo con las plántulas que crecen después (Subcomite de Plantas Nocivas, 1982).

En nuestro país, las arvenses poseen una gran importancia debido a que son las causantes del deterioro en la producción de los cultivos. Así en la zona del Bajío en 1965, el rendimiento en los cultivos del maíz se redujo hasta un 60 % debido a la competencia existente entre las arvenses y el propio cultivo. Las labores de limpieza a que obligan y los problemas que causan al levantar las cosechas, aumentan el costo de la producción aunado a que el producto baja en calidad cuando lleva impurezas (Carballo, 1966).

El estudio de las arvenses en nuestro país hasta el momento, se ha enfocado específicamente a la identificación de las diversas especies que infestan los cultivos básicos, al estudio de los daños que ocasionan a éstos y a determinar los métodos de control más convenientes en cada caso. Las arvenses más estudiadas son aquellas que infestan principalmente los cultivos utilizados para la alimentación básica para el hombre, como son las que se encuentran en los cultivos de trigo, sorgo, cebada, avena, maíz, frijol y arroz entre otros. En México el cultivo de maíz y de frijol son de gran importancia para la alimentación. Agudis (1984) ha demostrado que *Ipomoea purpurea*, comúnmente conocida como "campanita" o "manto" es una especie que infesta a estos cultivos, y ocupa un lugar importante en el deterioro de la producción de cada uno de ellos. Este autor ha demostrado que cuando esta arvense no es atacada en los primeros 30 días de su desarrollo, ocasiona un decremento en la producción de un 22 % a 33 % en las cosechas de maíz y frijol respectivamente.

B- EL GENERO *Iposoa*.

El género *Iposoa* consiste de alrededor de 40 especies de las cuales 17 se encuentran en México. Algunas son de importancia económica, ya sea como alimento como es el caso de *Iposoa batatas* (camote; IBMPGR, 1981) o medicinales como *Iposoa pes-caprae* (Martínez, 1969; Pongprayoon et al, 1991), e *Iposoa purga* (raíz de Jalapa; Matuda, 1963, 1964; Martínez, 1969).

Desde la década de los cuarenta y cincuenta se han descrito varias especies del género asociadas a los diferentes tipos de vegetación que existen en nuestro país. Para los años sesenta Matuda (1963, 1964) realiza una recopilación de las especies existentes en México del género *Iposoa*.

Los primeros estudios demuestran, que en la depresión del Balsas, en el que existe un bosque tropical caducifolio, se encuentra asociado a *Bursera* la especie más abundante, varias especies del género *Iposoa* (Miranda, 1941, 1942, 1943 y 1947). Este mismo autor en la región de Ixcócar de Matamoros, indica que la destrucción del bosque tropical caducifolio de *Bursera*, le sigue el establecimiento del matorral espinoso, el cual evoluciona hacia el bosque de *Iposoa wolcottiana* (cazahustera) y éste se transforma en una comunidad clímax (Miranda, 1942).

Bajo el nombre de matorral subtropical, Rzedowski y McVaugh (1966) describen una serie de comunidades vegetales que representan, al menos en parte, fases sucesionales más o menos estables del bosque tropical caducifolio. Un hecho notable en este tipo de vegetación en Aguascalientes y Jalisco, es que los elementos más característicos entre otros son *Iposoa intrapilosa* (palo bobo) e *Iposoa surocooides*.

En el extremo sur de Sonora y a lo largo de la Planicie Costera de Sinaloa, prevalece el bosque espinoso, dentro del cual se encuentra *Iposoa arborescens* (palo blanco; Rzedowski, 1963).

La vegetación de las playas arenosas y de sedanos directamente expuestos al mar en Campeche y Tabasco, se ha descrito la presencia de *Ipomoea pes-caprae* e *Ipomoea stolonifera* (Sauer, 1967). Así mismo en la Isla Socorro, a 500 Km de la costa de Jalisco, con una vegetación pobre, se ha encontrado a *Ipomoea pes-caprae* (Miranda, 1980).

Dentro del género *Ipomoea* se encuentran otro tipo de especies que causan daños a los cultivos y caminos como es el caso de *Ipomoea purpurea* e *Ipomoea x leucantha*, encontrándose en los cultivos de maíz, frijo o bien de arroz respectivamente (Agundis, 1984; López-Curto et al., 1990)

El género *Ipomoea* se encuentra dentro de la familia Convolvulaceae, que agrupa a individuos de tipo herbáceo, por lo común trepadores o rastrojos, o bien arbóreas. Tienen hojas alternas, pecioladas y sin estípulas. Sus flores son perfectas, con corola entera de margen pentagonal y con los estambres incluidos o salientes, son a menudo de tamaño desigual y pilosos en la base de los filamentos. El ovario es bi- o cuadrilocular y tetraovular, o trilocular o sextiovascular, mientras que el estilo es filiforme y contiene un estigma granuloso y más o menos bifido. *Ipomoea purpurea* es una hierba de tallo de poca consistencia, que trepa si encuentra sostén, generalmente es poco ramificada, con una longitud de 50 a 250 cm, con hojas cordadas, de borde entero, tri o pentalobado. flores con un caliz cubierto de pelos, corola en forma de embudo, con la parte inferior blanca y la parte superior púrpura. Los frutos son globosos, con restos del estilo evidente en forma de columna, de 1 cm de diámetro, de color café claro y contiene seis semillas de las cuales algunas son abortivas. La semilla madura deshidrata tiene forma de cuña, glabras de color café oscuro, con un peso alrededor de 30 mg (Conzatti y Smith, 1981). La planta es anual y su forma vegetativa se encuentra de Abril a Agosto, su floración es de Julio a Noviembre, mientras que su fructificación se encuentra de

Agosto a Diciembre. Se puede encontrar estas fases fuera de esta época, pero es desfavorable para la formación de la semilla (Villegas, 1979).

C- DESARROLLO EMBRIONARIO.

El óvulo se desarrolla a partir de la placenta del ovario, éste es el sitio de formación de la megaspora, y el desarrollo del saco embrionario o gametofito femenino. El óvulo comúnmente esta constituido de una nucela, o cuerpo central de células vegetativas que envuelven a las células esporogónicas; uno o dos integumentos que encierran a la nucela: el funículo, estructura que conecta el óvulo con la placenta. La región donde la nucela, los integumentos y el funículo emergen se denomina chalasa. En el inicio del desarrollo el óvulo posee una célula arqueosporial, la cual se divide periclinalmente para dar origen a dos células: una parietal y al megasporocito. En otro tipo de angiospermas con el óvulo teninucleado, la arqueospora funciona como un megasporocito (Davis, 1966). Por división meiótica dará lugar a cuatro megasporas haploides. El desarrollo puede seguir dos caminos: el primero en el cual una megaspora sobrevive, mientras que las tres restantes degeneran (Tipo Polygonium); o las cuatro megasporas sobreviven (Tipo Fritillaria). Por una serie de divisiones mitóticas se da origen a ocho núcleos, y se forma un saco embrionario octanucleado, que posteriormente completa la citocinesis. Después el saco embrionario sufre un rearrreglo; tres de las células que quedan en la región del micrópilo constituyen el aparato del huevo, compuesto por dos sinérgidas y la célula del huevo. En la región opuesta del saco embrionario se encuentran las células antipodales. Entre estos dos grupos existe una célula grande que contiene los dos núcleos polares (Bhatnagar y Johri, 1971; Esau, 1977).

Cuando las anteras se encuentran maduras, liberan los granos de polen, los cuales son diseminados por varios agentes como son el viento, el agua, las aves o los insectos. En el lapso que ocurre entre que el grano de polen se posa en el estigma y se forma el tubo polínico, se lleva a cabo una serie de fenómenos importantes para la fertilización. El tubo polínico, atraviesa el estilo y el ovario y alcanza el saco embrionario a través del micrópilo, proceso denominado fertilización porogámica. En otras ocasiones, el tubo polínico penetra el saco embrionario por la

chalaza y por ello se denomina fertilización chalazal (Bhatnagar y Johri, 1971). El tubo polínico contiene dos núcleos masculinos o espermatóicos. Cuando el tubo llega al saco embrionario, libera a estos dos núcleos. Uno de ellos se fusiona con la célula huevo para formar un cigoto diploide. El otro núcleo masculino se fusiona con los núcleos polares para dar un núcleo triploide. El desarrollo del cigoto para dar origen a un embrión comprende dos etapas: una inicial o proembrionaria y una final o propiamente embrionaria. Tanto en monocotiledoneas como en dicotiledoneas la etapa proembrionaria es muy similar. La división del cigoto no es sincrónica con la división del núcleo triploide o núcleo primario del endospermo, antecediendo ésta a la del cigoto. La división del cigoto generalmente es transversal. Debido a esto se producen dos células: la más pequeña y cercana a la cavidad del saco embrionario se denomina célula apical: la más grande, que se encuentra hacia el lado micropilar, se llama célula basal. Por la división del cigoto y su desarrollo subsecuente puede distinguirse cinco tipos según Maheshkari (1950):

- 1- La célula apical se divide longitudinalmente.
 - a- La célula basal juega un papel menor o ninguno en el desarrollo embrionario. Tipo Crucifera.
 - b- Ambas células (basal y apical) toman parte en el desarrollo del embrión. Tipo Asteridio.
- 2- La célula apical sufre una división transversal.
 - a- La célula basal juega un papel menor o nulo en el desarrollo del embrión.
 - i- La célula basal forma comunmente un suspensor de dos o más células. Tipo Solanum.
 - ii- La célula basal permanece sin dividirse y el suspensor, si se presenta, es derivado de la célula terminal. Tipo Carifilia.
 - b- Ambas células participan en el desarrollo del embrión. Tipo Chenopodium.

En las dicotiledoneas, cuando la emergencia de los dos cotiledones se inicia, la simetría hasta entonces axial se pierde y pasa a ser una simetría bilateral. Muchos embriólogos definen

este cambio como límite entre la etapa proembrionaria y la embrionaria. Se ha observado que existe una distinción clara entre el embrión propiamente dicho y el suspensor aun antes de que ocurra el cambio de simetría axial a bilateral, por lo que esta última característica no es en sí limitante entre la etapa proembrionaria y la embrionaria, cuando menos en las monocotiledóneas (Ecau, 1977).

En algunas etapas del desarrollo de la semilla de las angiospermas, ésta se encuentra constituida por un embrión, un endospermo, una nucela o sus derivados y una cubierta seminal. Las semillas maduras poseen un embrión (algunas veces poco desarrollado), cubierto por una testa distinguible. La existencia del endospermo o del perispermo en semillas maduras, varía según el grupo y la especie de la que se trate. En algunas ocasiones la testa existe en una forma rudimentaria y la estructura más externa es el pericarpio o cubierta del fruto, derivado de la pared del ovario.

Las semillas pueden caer dentro de dos categorías, aquellas que a la madurez poseen un endospermo y las que no lo poseen. El verdadero endospermo de origen triploide, solamente se encuentra en las angiospermas. Existen dos tipos importantes de desarrollo del endospermo: el primero de ellos o nuclear, se caracteriza por iniciarse con la división nuclear y posteriormente se da la formación de las paredes celulares; el segundo es el del endospermo celular, en donde nunca se observa una etapa nuclear libre. Este tipo de formación del endospermo lo encontramos tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Un tipo menos común y que se encuentra en las monocotiledóneas es el helobial (Bhatnagar y Johri, 1971). Los nutrientes son transportados hacia el endospermo desde los tejidos adyacentes durante el desarrollo de la semilla. El crecimiento del embrión llega a estar íntimamente asociado con el aporte de sustancias nutritivas durante la maduración, la subsecuente germinación y el estado de crecimiento. En cereales se encuentra una utilización limitada del endospermo durante la maduración del embrión, pero parte de él

puede ser hidrolizado en las zonas cercanas del escutelum. En cambio, en semillas de dicotiledoneas no endospermicas, el endospermo es hidrolizado y consumido durante el desarrollo embrionario, así como las sustancias de reserva acumuladas en los cotiledones. El endospermo puede permanecer como una estructura de almacenamiento en semillas maduras en las dicotiledoneas endospermicas (Cooper, 1938; Bewley y Black, 1985).

Las estructuras mas externas del óvulo, los tegumentos, durante el desarrollo sufren una serie de transformaciones y reorganización al formar la cubierta seminal o testa. La estructura de la testa es variable según la especie. Esta es de importancia en la semilla madura, debido a que interviene en la protección del embrión. La naturaleza protectora se encuentra adscrita a la presencia de una cuticula, generalmente impregnada de sustancias impermeables al agua, y de una o más capas de células protectoras (Bewley y Black, 1985).

Dentro del genero *Ipomoea* se han realizado una serie de estudios sobre el desarrollo de la semilla. Uno de los primeros realizados en *Ipomoea rubrocaerulea* Hook, asienta que los óvulos carecen de un verdadero tegumento (Woodcock, 1943). Maheswari (1944) refuta lo anterior y demuestra que existe un tegumento y que es la nucela la que desaparece rápidamente. Kaur y Singh (1983) estudian el gametofito femenino, el embrión, el endospermo, y la estructura de la testa de semillas de *Ipomoea obscura* Ker-Gawl. Estos autores realizan el mismo trabajo en *Ipomoea sinuta* Ortiz, e *Ipomoea purpurea* Jacq.

Govil en 1970 estudia el desarrollo de la testa de *Ipomoea purpurea* Roth, así como las testas de semillas maduras de *Ipomoea obscura* Ker-Gawl, *Ipomoea carnea* Jacq, *Ipomoea cairica* (Linn) Sweet, *Ipomoea seiparia* Koenig, *Ipomoea vitifolia* Sweet, *Ipomoea sindica* Stapff, *Ipomoea purpurea* Roth, e *Ipomoea quamoclit* Linn.

Ponce-Salazar et al (1980) estudian el desarrollo de la cubierta seminal de *Ipomoea purpurea* (L) Roth. Describen que el

Único tegumento del óvulo en la fase de antesis se encuentra constituido por la protodermis, la hipodermis y el parénquima pluriestratificado con abundantes sustancias de reserva. Durante el desarrollo, la protodermis da lugar a las células de la epidermis que se transformarán en tricomas. Por su parte la hipodermis se diferencia en la subepidermis monoestratificada y el esclerenquima en empalizada con dos o tres estratos. El parénquima se consume durante el desarrollo, y solo quedan las paredes celulares como una capa fibrosa y una cutícula que separa a la testa del endospermo.

Se ha descrito la existencia de *Ipomoea x Iseucanthe* híbrido de *Ipomoea trichocarpa* e *Ipomoea lacunosa* (Austin, 1978). Con esta especie se ha realizado un estudio del desarrollo de la semilla, en el que se describe que el único tegumento que forma el óvulo, se diferencia para dar origen a la testa, constituida por cuatro capas: la epidermis, la subepidermis monoestratificada, el esclerenquima en empalizada con tres o cuatro estratos celulares, y una capa fibrosa constituida por los residuos del parénquima. Por otra parte en este trabajo también se describe el desarrollo del endospermo de tipo nuclear, el cual en la madurez consiste únicamente de dos o tres estratos de células vivas (capa de aleurona) y el resto de las paredes celulares. El desarrollo del embrión empieza con la división del cigoto, que da una célula apical de la que se formará propiamente el embrión, mientras que la célula basal dará origen al suspensor. Para los cuatro días de desarrollo el embrión es globular, y a los seis días es acorazonado, mientras que la etapa de torpedo se encuentra a los ocho días. Para el décimo segundo día después de la antesis se empieza a diferenciar en los cotiledones los laticíferos y para los quince días los cotiledones son grandes y plegados con abundantes laticíferos. La formación de la semilla madura deshidratada y lista para su dispersión se alcanza en 25 días promedio después de la antesis (López-Curto, 1987; López-Curto et al; 1990).

D- SUSTANCIAS DE RESERVA EN LAS SEMILLAS.

Debido a que los granos y semillas de algunas plantas son ricas en almidón, de las 300 familias de las angiospermas, ninguna ha tenido tanto importancia para el hombre como las Gramíneas. La cebada y el trigo se encuentran estrechamente relacionados con el desarrollo de la civilización occidental, mientras que el arroz fue fundamental como alimento en las culturas orientales, y en América Precolombina la alimentación se basó fundamentalmente en el maíz. La fuente energética se encuentra almacenada en el endosperma de dichos granos, esto ha hecho que se seleccionen aquellos cultivos en los que el contenido energético de sus semillas sea mayor. Además de la utilización como fuente energética por el contenido de almidón para el consumo alimenticio, se han utilizado estos granos para la obtención de bebidas alcohólicas como es: el sake, la cerveza, el bourbon o el tequino, los cuales utilizan la fermentación de la glucosa proveniente del almidón. Por su parte las leguminosas no endospermas almacenan gran parte de sus reservas en los cotiledones, por eso en Mesoamérica se han utilizado como fuente alimenticia.

Los carbohidratos son la mayor fuente de reservas en la mayoría de los cultivos. El estudio de la utilización de las sustancias de reserva como son los carbohidratos y sus posibles implicaciones adaptativas, fisiológicas y económicas se han enfocado principalmente al almidón, el cual ha sido ampliamente estudiado en el tubérculo de la papa, y en granos de cereales. En menor grado se ha estudiado hasta donde sabemos, este compuesto en semillas dicotiledoneas no endospermas y muy poco se ha realizado en semillas de dicotiledoneas endospermas. Se conoce que el almidón en granos de cereales y en semillas de dicotiledoneas no endospermas cumple una función de sustancia de reserva útil durante la germinación. En el grupo de semillas endospermas, aunque menos estudiada, se ha determinado que el

carbohidrato utilizado como fuente de reserva durante la germinación es el galactomanano (Reid, 1971; McCleary y Matheson, 1975).

La composición y el origen del grano de almidón le da una morfología característica, y ésta depende de la especie de la cual se obtenga. El almidón es almacenado en los amiloplastos, los cuales son derivados de los proplastidios. La síntesis del grano de almidón en los cereales es iniciada en el proplastidio de las células del endospermo, con la formación de uno (maíz, y trigo) o más (avena, arroz) gránulos pequeños, el o los gránulos ocupan un pequeño espacio en el proplastidio. En la madurez de la semilla o grano, la mayor parte del gránulo se encuentra ocupado por éste polisacárido, el grano de almidón incrementa su tamaño y causa la deformación y eventualmente la pérdida de la estructura del cloroplasto, (Bain y Mercer, 1968; Pate y Flinn, 1977; Bowley y Black, 1985).

El grano de almidón, se encuentra compuesto de un 50 a un 90 % de amilopectina y el resto de amilosa. Ciertos cultivos poseen granos de almidón que tienen altas o bajas proporciones de amilosa lo cual los hace más o menos cotizados en el mercado y útiles para diferentes productos. Estos dos polisacáridos que forman el grano de almidón, se diferencian entre sí por sus propiedades físicas y químicas. Inicialmente fueron separados, de acuerdo a su solubilidad en agua a 70 °C; el componente soluble se le denominó amilosa, mientras que la fracción insoluble fue la amilopectina. Se ha observado que el aumento de temperatura de 70 a 90 °C produce un incremento en la proporción de la amilosa, por lo que el método inicialmente propuesto no es tan específico en su separación, por tal motivo se han buscado métodos alternativos que produzcan una separación específica de los dos componentes del almidón y que faciliten su determinación cuantitativa (Akazawa, 1976; Banks y Muir, 1980). En la actualidad se han utilizado diversos protocolos de extracción basados en el uso de etanol, alcohol amílico o propanol que fueron

propuestas desde la década de los cuarenta (Schoch, 1945) y que se han modificado en la actualidad para seguir siendo utilizados (Biliaderis et al, 1981; MacGregor y Morgan, 1984).

Se sabe que la amilosa es un polisacárido lineal, compuesto de residuos de glucosa unidos por enlaces α 1-4, con una conformación helicoidal. Su peso molecular varía entre 10,000 a 100,000 daltones (Wolfrom y Khadem, 1985; Eliasson, 1988). Se ha tratado de establecer la estructura de la amilopectina, la cual se ha abordado desde formas diferentes; la primera utiliza una metilización seguida de una hidrólisis y oxidación con periodato (Wolfrom y Khadem, 1985). El segundo recurre a una degradación enzimática como herramienta en la elucidación de la estructura, uno de los primeros estudios fue el realizado por Mauro y Kobayashi (1951). En la actualidad se ha utilizado el método enzimático para estimar la estructura de la amilopectina en la mayoría de los cereales, y de las leguminosas (Biliaderis et al, 1979, 1981). Por medio de estos estudios, se ha establecido que la amilopectina se encuentra formada por una secuencia de glucosas unidas entre sí por medio de enlaces α 1-4 y las ramificaciones están formadas por pequeñas cadenas de glucosa, generalmente de 20 a 25, unidos al resto de la molécula por enlaces α 1-6. Se ha podido estimar que el peso molecular de este componente es superior a 1,000,000 de daltones (Biliaderis et al, 1979, 1981; Preiss y Levi, 1980; Eliasson, 1988).

Los estudios cristalográficos y de difracción de rayos X han sido utilizados en el estudio de la estructura de la amilosa, se ha determinado que su conformación es de tipo helicoidal, donde se encuentran seis residuos de glucosa por giro. Por otra parte se ha demostrado que los complejos amilosa-yodo en que se obtiene un color azul, el yodo se encuentra en el centro de la hélice rodeado de seis residuos de glucosa. En los complejos de amilopectina-yodo en los que se obtiene una coloración violeta, se ha demostrado que únicamente intervienen las regiones ramificadas

de la cadena en la formación del complejo. Con base en estudios de este tipo, Kainumay French (1971) y French (1974) han propuesto un modelo de doble hélice para la amilopectina.

Tanto la amilosa como la amilopectina se encuentran organizadas en el grano de almidón en forma de una estructura cristalina organizada en dominios. Cuando se analiza por difracción de rayos X, se obtiene un patrón característico para los cereales denominado patrón A, mientras que el patrón para el almidón del tubérculo de la papa es diferente al anterior y se ha denominado como B, el patrón de difracción para las leguminosas se ha denominado C. En la actualidad se cree que estos patrones se encuentran en correlación con la disposición de la amilopectina dentro de la estructura cristalina del almidón. La amilopectina es una molécula de alto peso molecular, que se extiende desde el centro del gránulo hacia la periferia y que se encuentra en forma de grupos de ramificaciones. Estas ramas forman dobles hélices, que se empaquetan en una unidad ortorrómbica en el caso del almidón del tipo A, y en una unidad de forma hexagonal en el caso del almidón de tipo B. El patrón de tipo C es una combinación de los dos anteriores. La estructura cristalina del almidón se encuentra formada por una doble hélice de aproximadamente 5 nm de alto por 10 nm de diámetro, y a lo largo de la molécula de amilopectina se encuentran regiones en forma cristalina interrumpidas por regiones amorfas donde se encuentran las regiones ramificadas (Eliasson, 1988).

X- VIAS DEL CATABOLISMO DEL ALMIDON

Se conocen dos vías catabólicas del almidón: una hidrolítica y la otra fosforolítica (Ching, 1972; Bowley et al, 1978; Bowley y Black, 1985; Preiss, 1982). Se ha observado que la vía en la que se involucra a las amilasas en semillas dicotiledóneas no endospermaicas rinden más glucosa que maltotriosa, en comparación con los granos de cereales.

La vía amilolítica del almidón incluye la intervención de varias enzimas para la obtención de glucosa, entre las más importantes se encuentran la α amilasa y la β amilasa. Las propiedades y distribución de la α amilasa han sido ampliamente discutidas por Thoma et al (1971). La α amilasa es una metaloenzima dependiente de calcio, posee un pH óptimo para el caso de los cereales de 4.5 a 6.0. La hidrólisis del almidón por la α amilasa es bifásica, pues inicialmente la enzima somete al grano de almidón a una fragmentación rápida, que da como productos varias cadenas de maltodextrina (Greenwood et al, 1985). Posteriormente la α amilasa prosigue la hidrólisis de la maltodextrina que da como productos finales principalmente glucosa, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa y maltodextrinas de bajo peso molecular. Se han propuesto modelos matemáticos para explicar los patrones de hidrólisis de la amilosa o maltodextrina por medio de esta enzima, ya que este sustrato puede ser altamente soluble. Por su parte la hidrólisis de la amilopectina por medio de la α amilasa, da la producción de maltodextrinas grandes, pero una hidrólisis prolongada dará polisacáridos de bajo peso molecular y dextrinas ramificadas, debido a que esta enzima es incapaz de hidrolizar los enlaces α 1-6 (Thoma, 1971; Manners, 1974).

La determinación específica de la actividad de la α amilasa en extractos crudos se complica debido a la presencia de la actividad de la β amilasa. El método más utilizado involucra la

inactivación de la β amilasa por calor. Este procedimiento lo describió por primera vez Briggs (1964), y consiste en la determinación de la actividad de la α amilasa en extractos crudos en los cuales se inactiva en forma selectiva a la β amilasa por calentamiento a 70 °C durante 20 minutos en presencia de calcio. La α amilasa es termoestable bajo estas condiciones y su capacidad de hidrólisis ha sido determinada por la producción de poder reductor o por la desaparición del color dado por el complejo yodo-almidón (Stiti et al, 1978; Bulpin Apless, 1978; Adams et al, 1980; Hildebrand y Hymowitz, 1981). Otro procedimiento propone la posible inactivación de la β amilasa por la adición a bajas concentraciones de $HgCl_2$ (Hildebrand y Hymowitz, 1981). Este método se basa en la dependencia de la selectividad del $HgCl_2$ como inhibidor de la β amilasa, una premisa que no ha sido probada (Doehlert y Duke, 1983).

La α amilasa es una enzima que es fuertemente absorbida a los granos de almidón, la cual se encuentra inhibida por la presencia de la maltosa y/o dextrinas β límite, las cuales son potentes inhibidores de la actividad de la enzima. Esta propiedad ha sugerido un posible mecanismo de regulación (Manners, 1974).

Las diferentes isoenzimas de la α amilasa son sintetizadas *de novo* en la capa de la aleurona de los cereales durante la germinación o en respuesta a giberelinas exógenas (Jacobsen et al, 1970, Gubler et al, 1987). Los estudios realizados *in vitro* han podido sintetizar α amilasa a partir de su ARN^m. Dos de los productos han sido separados por precipitación por medio de anticuerpos, un polipéptido que co-emigra con la α amilasa en geles de poliacrilamida SDS y otro polipéptido con un peso molecular de 1,500 daltones más grande que la α amilasa. Estos resultados sugieren que el polipéptido más grande es un precursor de la amilasa en cuestión, el cual es hidrolizado proteolíticamente durante la germinación dentro de la capa de aleurona (Okita et al, 1979).

Por su parte la β amilasa es una exoenzima que ataca las terminales no reducidas del almidón, y produce como productos la β maltosa y la β dextrina límite (Thoma et al, 1971). Esta enzima se encuentra restringida a los vegetales y ha sido reportada en granos no germinados de trigo al igual que en la soya (Gertler y Birk, 1965; Tipples y Tkachuk, 1965), durante la germinación de cebada, sorgo y trigo entre otras (Daussant y Coruazier, 1970; Okamoto y Akazawa, 1979, Knari y Sapanen, 1986; Sapanen y Lauriere, 1989), en hojas de haba y espinaca (Chapman et al, 1972; Okita et al, 1979), en raíces de alfalfa y en camote (Balls et al, 1948; Doehlert et al, 1982) o durante la germinación de semillas de chícharo (Swain y Dekker, 1966).

Como la α amilasa, la β amilasa prefiere como sustrato a grandes polisacáridos. La β amilasa es una sulfhidril enzima y es inhibida por agentes que reducen a este tipo de grupos (Preiss y Levi, 1960). La pérdida de la actividad se encuentra asociada a la oxidación de los grupos tiol por reactivos como la idocetamina y el N-etilmaleimida. La inhibición reversible ha indicado que la oxidación de los grupos sulfhidrilo de la β amilasa causa cambios conformacionales, que permiten almacenar a la enzima en un estado inactivo.

La β amilasa es una enzima que únicamente puede hidrolizar los enlaces α 1-4 y no puede degradar las ramificaciones de la amilopectina. La degradación de la amilosa dará como producto a la β maltosa, mientras que la amilopectina por acción de esta enzima se convierte en β maltosa y una β dextrina límite (Bewley, 1978).

Una vez que se ha formado la dextrina límite por la acción amilolítica, esta debe de ser desramificada por medio de enzimas que ataquen a los enlaces α 1-6. Para los cereales se ha reportado una enzima R, y la dextrinasa límite (Bewley, 1978);

La maltosa formada es hidrolizada por la acción de la α glucosidasa, que rompe los enlaces α 1-4 de la maltosa, ataca desde el extremo no reductor y libera como producto a la glucosa. Su pH óptimo se encuentra entre 6.5 y 7.0, y es altamente activa en presencia de maltosa pero además puede escindir a la maltotriosa, maltotetraosa y a la nigerosa entre otras dextrinas, con un grado de actividad variable (Hutson y Manners, 1985; Preiss, 1982).

Se ha encontrado actividad de la fosforilasa del almidón en extracto de papa y de chícharo, además de una gran variedad de plantas que incluyen a la espinaca, plátano, camote entre otros (Fukui, 1983). Se le ha asignado una función principal en la degradación del almidón como vía alterna, aunque se ha propuesto que juega un papel en la síntesis de éste polisacárido en algunas plantas, como ha sido sugerido por Schneider et al (1981), Sivak et al (1981) y Suda et al (1986). Se han estudiado con énfasis las fosforilasas del almidón del tubérculo de la papa y en los granos de maíz, se ha reportado un gran número de isoenzimas, que difieren en el tiempo de aparición durante la germinación y en sus propiedades de regulación (Tsai et al, 1970). La fosforilasa del almidón se encuentra dentro de las enzimas capaces de hidrolizar al almidón, la cual incorpora un grupo fosfato en la ruptura del enlace α 1-4 entre el último y penúltimo residuo de glucosa en el extremo no reducido de la cadena del polisacárido. Esto da como resultado la formación de glucosa 1 fosfato que se libera del carbohidrato en cuestión, mientras que éste último queda al final con un residuo menos de glucosa. Esta enzima ataca repetidamente a la amilosa y a la amilopectina y degrada a esta última hasta dos o tres residuos de glucosa antes de la ramificación en que se encuentra el enlace α 1-6 (Bewley, 1978; Preiss y Levi, 1980).

F- MOVILIZACION DE CARBOHIDRATOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA.

El estudio desde diversos puntos de vista de las semillas, se ha centrado principalmente en aquellas que implican una utilidad para el hombre. Dentro de las semillas o granos de gran importancia, se encuentran las que se utilizan en la alimentación humana. Gran interés se ha desarrollado entorno de las gramíneas por su alto contenido de carbohidratos. El desarrollo de la civilización, se encuentra asociado a la domesticación y mejoramiento que se han hecho de ellas. Otro grupo de importancia aunque menos estudiado, es el de las leguminosas. Dentro de éstas se ha enfocada la atención a las semillas que en la madurez únicamente poseen cotiledones, como es el caso del frijol, la soya, la haba y el chícharo entre otras. Dichas semillas no solo son ricas en carbohidratos de reserva sino también contienen una cantidad considerable de proteínas y/o lípidos. Un grupo menos estudiado son las dicotiledoneas que en la madurez poseen además de los cotiledones un endospermo.

Debido a los intereses del presente estudio, únicamente se restringiré a los avances en el conocimiento que se han realizado en las dicotiledoneas.

Durante la etapa de desarrollo de una semilla, el embrión requiere de un aporte de diversos nutrientes, que provienen de la planta madre. Estudios realizados en *Pisum sativum* (chícharo), la mayor fuente de carbono para el desarrollo, proviene de la fotosíntesis que ocurre en los tejidos del fruto y en las hojas del nódulo vecino. La cantidad de sustancias de reserva que se acumulan en la semilla depende en gran medida de la asimilación que se realice durante la formación del fruto (Bewley et al, 1983).

En las primeras fases del desarrollo de una semilla dicotiledonea no endospermaica, los nutrientes que son requeridos

para el desarrollo del embrión provienen del endospermo. Los compuestos que son requeridos más tarde para la deposición de las sustancias de reserva dentro de los cotiledones, son suministrados por el resto de la planta. Este suministro de nutrientes es facilitado por la presencia de un haz vascular que entra a través del funículo y pasa al parénquima del tegumento (Hardham, 1976).

En el caso del chícharo, el frijol, y la soya, la sacarosa que llega al fruto, puede ser almacenada temporalmente en forma de almidón dentro de las paredes del fruto, previo a su removilización y transferencia a la semilla (Bain y Mercer, 1966; Adams et al, 1980; Van Caeseele y MacGregor, 1988; Rochat y Boutin, 1989).

Se encuentra ampliamente aceptado que la semilla en desarrollo obtiene sus nutrientes a través del floema. Thorne (1985) ha descrito la vía mediante la cual son transferidos los solutos. Se propone la existencia de una transferencia simplástica a través del parénquima del tegumento. Se ha propuesto que dicha transferencia se realiza mediante los plasmodesmos existentes entre célula y célula. Estudios suministrando sacarosa radioactiva a semillas en desarrollo, demuestran que este carbohidrato se acumula homogéneamente en la capa más interna del parénquima del tegumento, antes de ser translocada al saco embrionario. Esta capa interna del parénquima, consiste en células que han aumentado su superficie de membrana para aumentar la capacidad de secreción de los diversos nutrientes hacia el saco embrionario (Patrick y McDonal, 1980; Thorne, 1980).

En los cloroplastos de las células de la epidermis y de la hipodermis, que forman parte de la cubierta seminal, pero alejadas de la zona vascular del parénquima del tegumento, se ha detectado una cantidad de almidón en el caso de la soya (Thorne, 1981).

Se ha demostrado que el caso de la soya, la sacarosa es el

carbohidrato que principalmente se secreta al saco embrionario, aunque perfiles obtenidos de la composición del saco embrionario demuestran un contenido substancial de azúcares reductores, particularmente glucosa (Fader y Koller, 1985; Thorne, 1985), lo que demuestra la existencia de una poza de secreción de glucosa en la cubierta seminal. Estudios realizados en frijol, comprueban que el flujo de sacarosa es mayor que el de glucosa (Wolwinkel y Amerlaan, 1985), mientras que en el chícharo la cubierta seminal puede secretar ambos azúcares (Wolwinkel y Ruitter, 1985).

Una vez que la sacarosa pasa del saco embrionario a los cotiledones, ésta es utilizada cuando menos en parte para la síntesis del almidón. Se ha observado que el chícharo, a las 2 o 3 semanas posteriores a la antesis, aparecen pequeños gránulos de almidón en los cotiledones, y que la cantidad de éste polisacárido aumenta conforme transcurre el desarrollo (Smith, 1988; Rochat y Routin, 1989). Un patrón diferente de acumulación ocurre en la soya, donde se da un sustancial incremento en la cantidad de almidón en los cotiledones durante el desarrollo, seguido por un decremento, de forma tal que al final del desarrollo, la semilla madura posee restos del polisacárido (Adams et al., 1980). Esto es debido a que el almidón es removido en estados tardíos del desarrollo para proporcionar los esqueletos de carbono para la síntesis de proteínas y de lípidos (Bewley et al., 1983).

Los requerimientos de hexosas y hexosas fosfato que durante el desarrollo necesite las células del parénquima del tegumento, deben de ser derivadas de la sacarosa importada por el haz vascular. La sacarosa puede ser hidrolizada a UDP-glucosa y fructosa por la sacarosa sintetasa. Posteriormente la UDP-glucosa puede generar glucosa 1 fosfato mediante la intervención de la UDP-glucosa pirofosforilasa. Estas reacciones se han estudiado ampliamente en cotiledones en desarrollo de frijol (Hawker, 1971), en embriones en desarrollo de chícharo (Edwards y ap Rees, 1988 a y b), pero no se ha encontrado en cubierta seminal de semillas de leguminosas (Murray, 1988).

Durante la formación de la semilla, se ha descrito la presencia de α amilasa en las paredes de los frutos que contienen almacenado temporalmente al almidón, que posteriormente será removilizado hacia el embrión. En *Brassica campestris* y *Brassica napus* se caracterizó a esta amilasa, determinando que pertenece a la familia de isoenzimas de punto isoelectrico bajo (Van Casselle et al, 1981; Van Casselle y MacGregor, 1983), que se han encontrado unicamente durante el desarrollo de granos de cereales (MacGregor et al, 1984).

Se ha encontrado que en semillas de soya existen altos niveles de β amilasa (Birk y Waldman, 1965; Adams et al, 1980), mientras que los niveles de α amilasa y de fosforilasa del almidón son bajos (Feat et al, 1949; Yin y Sun, 1948). Hildebrand y Hymowita (1981) demuestran que la actividad amilolítica se encuentra en su máximo a los 20 días de desarrollo, coincidiendo con la mayor cantidad de almidón. Estos mismos autores demuestran que la actividad de la α amilasa es el 10 % de la actividad total, determinada como la fracción termolabil. También observan que la actividad de la fosforilasa del almidón es baja, siendo mayor al inicio del desarrollo de la semilla.

En contraparte, en los estudios realizados en chícharo, encuentran actividad de la fosforilasa del almidón durante el desarrollo de la semilla. La máxima actividad se detecta entre el 50 % y el 75 % del desarrollo según la variedad empleada. Dicha actividad decrece conforme la semilla llega a la madurez (Matheson y Richardson, 1976). Se han diferenciado dos fosforilasas del almidón: una que funciona principalmente como degradativa y con baja actividad, de estructura constituida por una subunidad; mientras que la otra fosforilasa del almidón, posee mayor actividad, con una estructura más compleja que la anterior, y se le adjudica una función en la síntesis del almidón (Matheson y Richardson, 1976).

En cotiledones en desarrollo de una semilla que no almacena almidón como es el caso de *Lupinus luteus*, los niveles de la fosforilasa del almidón permanecen muy bajos (Matheson y Richardson, 1976). En el caso de *Vicia faba* (haba) se ha reportado la presencia de fosforilasa del almidón (Matheson y Richardson, 1976).

En el caso de las leguminosas endospermaicas (aquellas que en la madurez conservan tanto los cotiledones como el endospermo) son únicas en que no contienen almidón hasta que éste es sintetizado como una reserva temporal después de que se ha iniciado la germinación (McCleary y Matheson, 1974, 1975; Bawley et al, 1983). La fuente principal de reserva en estas semillas se deposita en las paredes celulares, como es el caso del galactomanano, el cual forma parte de las paredes de las células del endospermo (Meier y Reid, 1977; Campbell y Reid, 1982). El galactomanano se encuentra como un componente mayoritario en el endospermo de semillas de un gran número de familias como es Leguminosae, Palmae, Anonaceae, Rubiaceae y Convolvulaceae. El galactomanano se sintetiza en etapas tempranas del desarrollo, como en *Trigonella*, siendo acumulado hasta que se ha alcanzado la madurez. La formación del galactomanano se inicia en las vesículas del retículo endoplásmico rugoso, y el polímero es secretado a través del plasmalema al espacio extracelular; los mecanismos finos de síntesis y secreción no se han estudiado en detalle. La sacarosa puede ser la principal fuente de manosa y fosfato para la síntesis del galactomanano, y ser transformada a glucosa GDP (Bawley y Black, 1985).

III- OBJETIVOS.

El proyecto titulado: " Catabolismo del almidón durante el desarrollo de la semilla de *Iposoa purpurea* , arvense del maíz" se encuentra enmarcado en la línea de investigación titulada: "Movilización de las Sustancias de Reserva Durante el Desarrollo, Germinación y Establecimiento de la Plántula"

El objetivo general del proyecto es el de localizar y cuantificar la cantidad de almidón, así como de la actividad amilolítica y/o fosforolítica existente durante el desarrollo de la semilla de *Iposoa purpurea*, en el lapso comprendido entre la antesis y la semilla madura hidratada.

Los objetivos particulares del proyecto son:

- a- Determinar la cantidad de almidón durante las distintas etapas del desarrollo de la semilla.
- b- Localizar la o las regiones en las que se encuentre contenido el almidón durante el desarrollo.
- c- Determinar los cambios existentes en la actividad catabólica del almidón, al estudiar tanto la vía hidrolítica como la vía fosforolítica existente, desde la antesis hasta la semilla madura hidratada.

IV- MATERIALES Y METODOS.

A- MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron semillas en diferentes estados de desarrollo, desde la antesis hasta la semilla madura hidratada de *Ipomoea purpurea* (L) Roth. Las semillas maduras deshidratadas fueron recolectadas en el estado de Morelos México. Este material se puso a germinar en condiciones de esterilidad, realizando un lavado previo con hipoclorito de sodio al 2% durante 15 minutos. El material desinfectado se escarificó y se puso a germinar en una cámara húmeda a 25 °C en oscuridad hasta la protrusión de la radícula. Una vez que emergió y alcanzó los 5 cm de longitud, se sembró en macetas de barro que contenían una capa de tezontle, seguida de una capa de arcilla y por último una capa gruesa de tierra vegetal. A la planta se le colocó una guía para que se enredara.

Una vez que inició la floración se determinó el tiempo de desarrollo, se tomó como tiempo inicial al día de la antesis y los días subsiguientes como días de desarrollo de la semilla. Se recolectaron los frutos en diferentes estados de desarrollo e inmediatamente fueron fijados en formal:ácido acético:alcohol (FAA) durante un mes. Posteriormente se pasó a alcoholes de graduación creciente hasta llegar al de 70 %, donde se conservaron hasta su uso.

B.- AISLAMIENTO DE LOS GRANOS DE ALMIDÓN.

El método utilizado para la extracción de los granos de almidón se diseñó a partir de los métodos propuestos por MacGregor (1979) y Biliaderis et al (1979), se tomaron éstos como base y se realizaron las modificaciones necesarias para el estudio planteado. El método utilizado se puede observar en la figura 1a, el cual consiste en la obtención de la semilla de mayor tamaño



Pesar el material biológico y homogeneizar en una solución de azida de sodio 0.02%



Filtrar por papel Whatman.



Incubar a 4 °C con luz blanca durante 1 hora. Agregar solución de Iodol.



Centrifugar a 2 500 g durante 15 minutos



Filtrar por una malla de 100 µm



Centrifugar a 2 500 g durante 15 minutos.



Deshidratar en alcoholes graduales



Centrifugar a 2 500 g durante 15 minutos.



Extracción de lípidos mediante hexano durante 48 horas.



Desecar a temperatura ambiente.

Fig. 1a- Diagrama del método de extracción de los granos de almidón

de cada fruto de diferente edad, la cual hemos denominado semilla líder, la que es homogenizada en un volumen mínimo de una solución de azida de sodio al 0.02 % . Se agregan 160 μ l de una solución de I₂-KI o lugol (I₂: 12.7g, KI: 30g, H₂O: 1,000 ml) y se filtra el homogenado por mucelina. Posteriormente se agita el filtrado por espacio de una hora en un baño agua-hielo. Al término se centrifuga a 3,500 veces la gravedad durante 15 minutos. Se extrae el sobrenadante y se desecha, el precipitado se resuspende en un volumen máximo de 2 ml de solución de azida fría, y se filtra por una malla de 100 μ m. Nuevamente el filtrado es sometido a centrifugación en las mismas condiciones. Para la extracción de lípidos se utilizó el hexano, con este fin el botón obtenido anteriormente se resuspende en 5 ml de etanol al 70 %, permaneciendo en el durante un tiempo mínimo de 15 minutos. Al finalizar se centrifuga bajo las mismas condiciones que las iniciales y el botón se resuspende en etanol al 100 % durante 20 minutos. Pasado este tiempo se decanta el alcohol y es sustituido por hexano, manteniéndose en él durante 48 horas, realizando dos cambios en este lapso. Posteriormente se sustituye el hexano por alcohol 100 % y este a su vez por alcohol al 80%, usando de éste último el menor volumen para transvasar el almidón a un recipiente de amplia superficie para su desecación a temperatura ambiente (20 a 25 °C). En la extracción se incluye un estándar en paralelo, consistente en almidón de papa previamente pesado al inicio de la técnica, el cual es sometido en forma simultánea a la extracción, con el fin de determinar la eficiencia de recuperación de la técnica.

C- EXTRACCION DE LIPIDOS DE LOS GRANOS DE ALMIDON.

Para la formación del complejo yodo-almidón y su cuantificación correcta, deben de extraerse del grano de almidón algunos compuestos que pueden interferir en su determinación. Uno de estos compuestos son los lípidos, y en particular aquellos que poseen enlaces insaturados, ya que estos pueden en algún

momento alterar las concentraciones de yodo libre en el ensayo. Para ello se utilizó el almidón de papa, extraído por nosotros según el método presentado anteriormente, como modelo en la extracción de lípidos. Para la extracción de estos compuestos se utilizaron los siguientes solventes: metanol, etanol, hexano y dimetil sulfóxido (DMSO). La proporción de almidón:solvente fue de 1:30 (p:v). En el caso del etanol y del etanol se utilizó una solución al 85% según Biliaderis et al (1981) y se incubó a 60 °C durante 48 horas con agitación constante. En el caso del hexano se agregó directamente, mientras que el DMSO se utilizó en una solución al 90 % según Knutson (1986) y ambos se mantuvieron a temperatura ambiente con agitación continua durante 48 horas. Para cada solvente se realizaron dos cambios. En el caso particular del DMSO, como el almidón se solubiliza en él, para efectuar los cambio se precipitó el almidón con etanol, y nuevamente se resuspendió en el DMSO al 90 %. Al final del tiempo de la extracción las muestras se deshidratan a temperatura ambiente dentro de un desecador. Posteriormente las muestras obtenidas se solubilizaron en agua (1:1000, p:v) y se someten a un baño de ebullición durante 15 minutos. Se dejaron enfriar y se recuperó el volumen perdido por evaporación. Se realizó una serie de diluciones de las muestras gelificadas, y se les agregó 20 µl de una solución de I₂-KI para la formación del complejo yodo-almidón y se determinó su absorbencia a 620 nm.

D- CANTIDAD DE I₂-KI REQUERIDA PARA SATURAR AL ALMIDON.

Debido a que la cantidad de yodo agregada a los diferentes ensayos puede ser un factor limitante, y por él subestimar la cantidad tanto de almidón en la semilla, como del almidón consumido durante los ensayos enzimáticos, es importante optimizar la cantidad de éste reactivo que debe ser agregado a los diferentes ensayos (Knutson et al, 1982). Por tal motivo se diseñó el siguiente experimento, el cual consistió en hacer diluciones de una solución de almidón soluble de Merck al 0.1%, la cual se obtuvo al poner la suspensión de almidón en un baño a 92 °C



Tomar la muestra a analizar



Diluir en hidróxido de potasio 0.5 M a fin de obtener a temperatura ambiente durante 48 horas



Sumar a un baño de ebullición durante 30 minutos



Agitar

Sedimentar durante una hora



Tomar una alícuota de 10 a 100 μ l



Amplificar a pH 4.7 con acetato



Determinar su absorbancia a 620 nm



Añadir 20 μ l de solución de iodoacido

Fig. 1b- Diagrama del método de cuantificación del almidón.

durante 15 minutos, tiempo suficiente para su solubilización. El ensayo se realizó en un volumen final de un mililitro, conteniendo 50, 100, 150, 200, 250, y 500 μ g de almidón a los que se les agregó a cada una de ellas una cantidad de yodo que fluctuó de 0.23 a 4.6 μ moles. Se determinó su absorbencia a 620 nm. Posteriormente se realizó un análisis matemático con el fin de obtener la cantidad de yodo requerido para la saturación del almidón según Burt (1980), Enna (1980) y Birnbaumer y Swartz (1981).

E- CUANTIFICACION DEL ALMIDON.

El método utilizado para la cuantificación de las muestras extraídas anteriormente, es una modificación del método propuesto por Juliano (1971) y Laundry y Smyth (1988). En la figura 2b se observa un diagrama del procedimiento seguido, en el que la muestra a determinar se gelifica en un volumen conocido de 0.5 M de KOH, se deja durante 72 horas a temperatura ambiente, en caso de ser necesario se somete a un baño a ebullición durante 30 minutos y una vez enfriada se recupera el volumen perdido por evaporación. Posteriormente se acidifica con HCl 1 N. Se toma una alícuota de volumen conocido y se lleva a 1 ml con amortiguador de acetatos 0.2 M pH 4.7. Para la formación del complejo yodo-almidón, a la muestra amortiguada se le agregan 20 μ l de I⁻-KI acidulada (I⁻ : 12.7 g, KI : 30 g, HCl 1N : 2.2ml, H₂O : 1,000ml), se agita y se determina su absorbencia a 620 nm. Se realizó una curva patrón empleando al almidón soluble de Merck.

F- ANALISIS HISTOLOGICO.

Simultáneo a la cuantificación del almidón se realizan las observaciones histológicas e histoquímicas para determinar la localización de los granos de almidón en semillas en desarrollo. Para ello se toma del mismo fruto del cual se extrajo la semilla líder para la cuantificación de almidón, la segunda semilla en peso, con la condición de que su peso no difiera más de un 10 %

del peso de la semilla líder. Esta semilla se deshidrata en alcoholos de graduación creciente durante 2 horas cada uno. Posteriormente se pasa a xileno durante 2 horas, y de ahí a xileno:parafina (2:1) a 58 °C durante 24 horas. Al término de lo cual se pasa a xileno:parafina (1:1) durante 24 horas más y por último a parafina pura a 58 °C permanece en ella por 24 horas para su total inclusión. Una vez incluida se procede a realizar los bloques y a la obtención de cortes de 10 μ m, los cuales son montados directamente sobre portaobjetos. Los cortes son desparafinados e hidratados previo a su tinción con una solución de I₂-KI (solución diluida 1/10 de la especificada anteriormente) durante 30 a 60 segundos, después de lo cual es retirado el exceso de solución y se lava rápidamente con agua para su observación (Johansen, 1940; Berlyn y Mirscho, 1976). Mientras que otra parte de los cortes se tifen para proteínas según la técnica de Nohisuki y Furukawa (1987) que utiliza el reactivo de azul brillante de Coomassie.

G.- EXTRACTO ENZIMÁTICO.

El paso inicial para la obtención del extracto enzimático consistió en la disección de las semillas en las fases en las que es posible, seguida de la obtención de su peso y la elección de las semillas de peso semejante de cada fruto, o bien si la diferencia entre ellas es muy grande se elige a la semilla líder. El material se homogeniza en un amortiguador de acetatos 0.01 M pH 6.0 con 0.01 M de CaCl₂, 0.003 M de NaF y 0.005 M de β mercaptoetanol en una relación de 0.04 g de peso fresco de las semillas por mililitro de amortiguador. Posteriormente se incuban en agitación constante a 4°C durante una hora. Al término de ese tiempo se centrifuga a baja temperatura a 10,000 g durante 20 minutos. Se recupera el sobrenadante al cual se considera como extracto enzimático crudo (Okamoto y Akazawa, 1979; Beleida y Varriano-Marston, 1981; Abdul-Hussain y Varriano-Martston, 1982).

H- CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA.

La determinación de la actividad amilolítica en el desarrollo de la semilla de *Iposcos purpurea* se obtuvo al cuantificar la actividad de la enzima existente en los extractos bajo las siguientes cuatro condiciones: a) extracto crudo a pH 6.0 (actividad total a pH 6.0); b) extracto crudo a pH 6.0 inactivado por calor a 70 C durante 20 minutos (actividad termoestable a pH 6.0); c) extracto crudo a pH 4.8 (actividad total a pH 4.8); d) extracto crudo a pH 4.8 inactivado por calor a 70 C durante 20 minutos (actividad termoestable).

La actividad amilolítica se determinó en un ensayo con un volumen final de 1.2 ml que contiene de 100 a 400 μ l de extracto enzimático crudo según lo indicado anteriormente, 300 μ l de almidón soluble de Merck (4 mg/ml) en amortiguador de acetatos 0.01M de CaCl₂ y 0.02% de asida de sodio a pH 6.0 o 4.8 de acuerdo al extrato a ensayar, y la cantidad necesario del mismo amortiguador para completar el volumen final. Se incubó durante 1, 2, 5, 10, y 15 minutos, y se tomó una alícuota de 100 μ l de la mezcla de reacción la cual se recibió en un tubo que contiene 20 μ l de una solución de I₂-KI (I₂ : 12.7 g, KI : 30 g, H₂O : 1,000 ml). Se diluye la muestra y se determina su absorbencia a 620 nm. Se asegura que la actividad amilolítica con las diferentes cantidades de extracto guarden la linealidad entre la actividad vs la cantidad de extracto agregado al ensayo.

I- CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD FOSFOROLITICA.

El método utilizado para la cuantificación de la actividad enzimática de la fosforilasa del almidón, es una modificación de Kobayashi y Yatsuka (1969) y Suda et al (1966, 1967), el cual desarrolló inicialmente Whelan (1955). La determinación de la actividad de la fosforilasa del almidón, se realizó en un volumen de reacción de 300 μ l que contienen 1.5 mg de almidón soluble de

Merck, 10 mM de glucosa 1 Fosfato, en amortiguador de acetato de sodio 10 mM pH 6.0, que contiene 6 mM EDTA y 10 mM de NaF y 50 a 200 μ l de extracto crudo. La reacción se detiene a los 0, 2 o 5 minutos de iniciada, al agregar 30 μ l de HClO₄ al 60 %. Posteriormente se lleva con agua a un volumen de 1.1 ml. Se centrifuga a 2,500 g durante 5 minutos. Se extrae 1 ml del sobrenadante al cual se determinó la cantidad de fosforo liberado por el método de Tausky y Shorr (1953). El cual consiste en agregar 0.5 ml de la solución de reacción (H₂SO₄ 10 N: 26 ml, (NH₄)₂ MoO₄ 4 H₂O : 16 g, FeSO₄ 7 H₂O : 0.6 g, H₂O: aforar a 10 ml) por cada mililitro de sobrenadante de la actividad fosforolítica y se determina su absorbencia a 660 nm, se interpola en una curva patrón de fosforo realizada con NaH₂PO₄ con un intervalo de 0.1 a 0.7 μ mol/ml. Para este tipo de ensayo se guardo la precaución de utilizar material libre de fosforo para impedir la interferencia de éste en la determinación enzimática.

J- CUANTIFICACION DE LA CANTIDAD DE PROTEINA.

La cantidad de proteína de los extractos se cuantificó mediante el método de Lowry et al (1951) modificado por Stoscheck (1990), en el que se utilizó como estandar a la Albumina de Suero Bovino.

K- ANALISIS DE LOS DATOS.

Una vez que se obtienen los resultados, es conveniente encontrar la mejor representación gráfica de los mismos, lo cual nos permite un análisis más adecuado, además de que posteriormente se puede realizar una inferencia de ellos. Un método muy utilizado es la representación gráfica de los datos. Desde hace algunos años se ha venido utilizando programas de computación para realizar lo que Tukey (1977) ha denominado el método de suavización resistente. Dicho método nos permite el confirmar mediante un modelo probabilístico, las observaciones cualitativas que se realizan en una gráfica, resaltando las tendencias

existentes en el conjunto de datos.

En algunas ocasiones, la representación original de los datos dificulta su análisis. Para resolver este problema se ha encontrado que al transformar la escala original en otra nueva ayuda a su interpretación. En Biología un tipo común de curva que se encuentra es la sigmoide, la cual se ha podido transformar en una recta de acuerdo a una derivación matemática como lo muestra Batschelet (1976) y Smith (1977).

Una herramienta muy útil es el análisis de regresión, mediante el cual se determina la dependencia entre las variables. Hay que tener en cuenta que un supuesto importante en el modelo de regresión lineal clásico, es que no exista autocorrelación, o sea que un dato perturbe o influya en el subsecuente; además que exista homoscedasticidad, lo cual implica que el conjunto de datos posea la misma varianza (Chatterjee y Price, 1977; Gujarati, 1981).

V- RESULTADOS.

A.- ESTABLECIMIENTO DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DEL ALMIDÓN.

Existen varios parámetros del método de extracción del almidón que requieren cuidado y que es conveniente mencionar. Un parámetro de importancia es la eficiencia de extracción del almidón mediante la técnica propuesta, la cual se obtiene mediante un estándar de almidón de papa de peso conocido que se procesa en paralelo al lote de muestras problemáticas. Mediante este control que es sometido al mismo procedimiento y por lo tanto refleja los posibles efectos sobre las pérdidas que puedan ocurrir durante la extracción, se ha determinado de las diversas extracciones que el porcentaje de eficiencia es de $90.3 \pm 5.7 \%$, el cual es considerado como un valor aceptable.

Una posible fuente de error en el momento de estar determinando la cantidad de almidón de las muestras, es la presencia de lípidos, por lo cual es importante purificarla de esta posible interferencia. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2, en la que se observa una gráfica absorbancia vs cantidad de almidón para diversas proporciones de almidón de papa, almidón soluble de Merck y almidón "Linit", que sirvieron como controles; así mismo se observa en la figura al almidón de papa tratado con: metanol, etanol, hexano o dimetil sulfóxido (DMSO) con el fin de extraerle los lípidos. Las curvas obtenidas de esta forma reflejan la afinidad del almidón por el yodo. Los resultados muestran a dos grupos de rectas: uno de ellos incluye al almidón soluble de Merck, el cual se encuentra libre de lípidos, el almidón "Linit" y el almidón de papa que se trató con hexano. El segundo grupo posee una pendiente menor que el anterior, incluye al almidón de papa que no ha sido tratado, así como al almidón de papa tratado con metanol, etanol y DMSO. Los resultados muestran que el almidón de papa sin tratar posee una pendiente menor al almidón de papa tratado con hexano, esta es

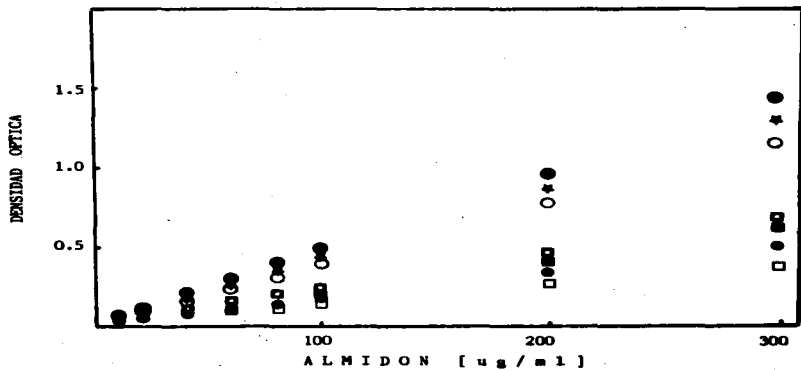


Fig 2- Efecto del tratamiento del almidón de papa con diferentes solventes. La figura muestra al almidón de papa (●), almidón soluble de Merck (○), y almidón "Linit" (●) que sirvieron de control. Al almidón de papa se trató con diferentes solventes: etanol al 85 % (□) o etanol al 85 % (■), ambos se incubaron a 60 °C durante 48 horas; con DMSO al 90 % incubando durante 48 horas a temperatura ambiente (□); y con hexano incubando durante 48 horas a temperatura ambiente (*).

muy similar al de los almidones "Linit" y de Merck que no contienen lípidos, lo que implica que el hexano extrae una serie de componentes lipídicos que interfieren con la cuantificación y por ello puede subestimarse la cantidad del almidón.

B- DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE I₂-KI REQUERIDA PARA SATURAR AL ALMIDON.

Los resultados obtenidos al realizar el ensayo para determinar la cantidad de I₂-KI requerida para saturar el almidón se muestran en la figura 3a, en donde nos indica que existe una relación proporcional entre la cantidad de yodo requerido para saturar concentraciones crecientes de almidón. Se observa que el comportamiento de saturación se ajusta a una hipérbola cuadrada para cada una de las diversas cantidades de almidón ensayado. Se tiene que el valor máximo de absorberencia para cada cantidad de almidón, tiende al valor de la asíntota de la hipérbola; para obtener con precisión este valor se puede ajustar a una recta mediante la transformación por doble recíproca de los parámetros graficados (Fig. 3b). Para cada una de las cantidades de almidón ensayado se obtuvo una transformación, del cual se puede obtener el valor del intercepto de las ordenadas (Fig. 3b). El inverso de éste valor nos puede indicar la máxima absorberencia a la que tendería una cantidad determinada de almidón si la cantidad de yodo fuera infinita. Graficando este parámetro obtenido vs la cantidad de almidón ensayado, se muestra que existe una relación lineal entre la cantidad de almidón y la absorberencia máxima (Fig. 3c).

Considerando como el 100 % la absorberencia máxima para cada cantidad de almidón ensayado, se puede transformar los valores de absorberencia original (Fig. 3a) en en porcentaje de saturación, lo cual se muestra en la figura 3d, el modelo obtenido se ajusta a una hipérbola cuadrada. Se observa que el máximo de saturación obtenido oscila entre el 85 y el 90 % y que en ninguno de los

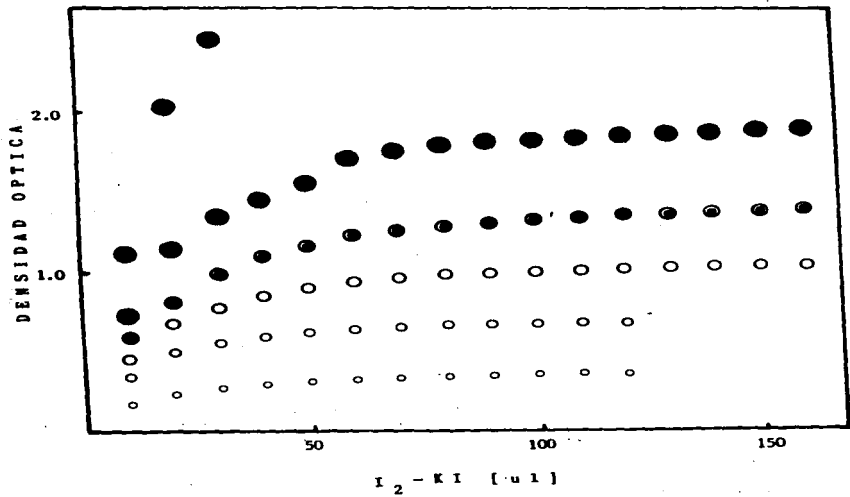


Fig. 3a- Efecto de la concentración creciente de yodo en la formación del complejo almidón-yodo. Se utilizaron las siguientes cantidades de almidón: 50 mg/ml (○), 100 mg/ml (○), 150 mg/ml (○), 200 mg/ml (●), 250 mg/ml (●) y 500 mg/ml (●). A cada cantidad de almidón ensayada se le agregó una cantidad creciente de I₂-KI.

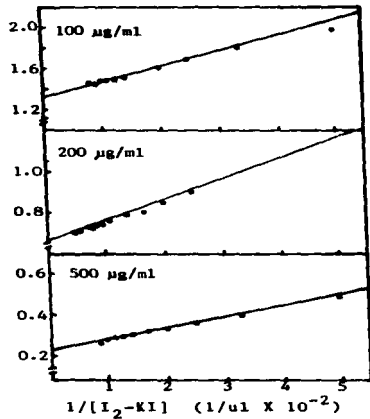
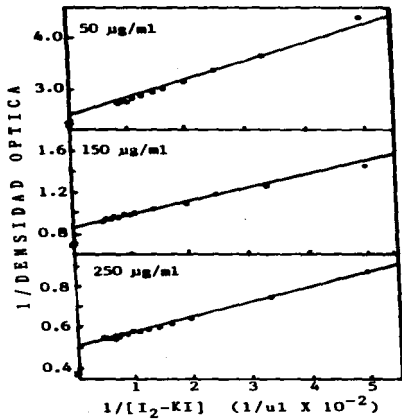


Fig. 3b- Transformación por doble recíproca del efecto de la concentración de yodo en la formación del complejo almidón-yodo

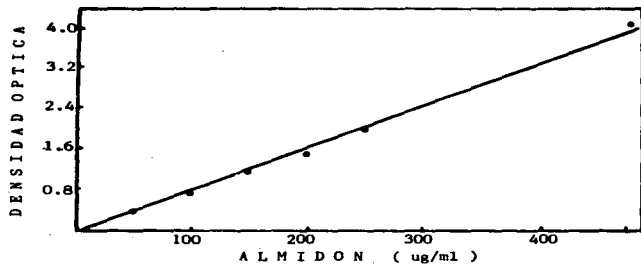


Fig. 3c- Relación lineal entre la absorbencia máxima para diferentes cantidades de almidón.

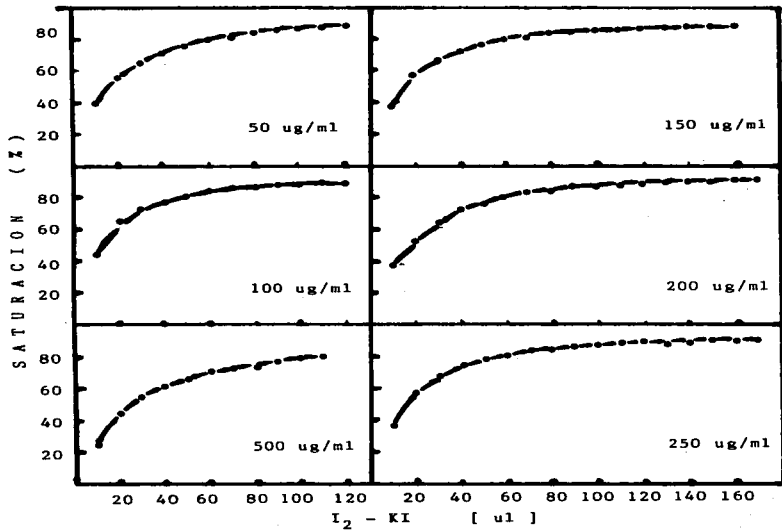


Fig. 3d- Gráfica de saturación vs la cantidad de I₂-KI agregado. El valor del intercepto de la recta en la ordenada de la figura 3c se determina como el 100 % de saturación, valor utilizado para transformar los datos originales de absorbencia en porciento de saturación.

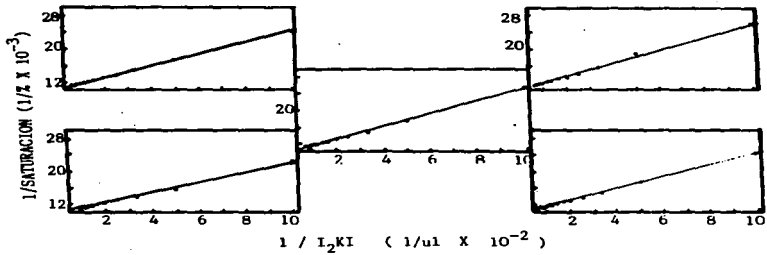


Fig. 3e- Transformación por doble recíproca de la saturación vs la cantidad de Is-KI agregado.

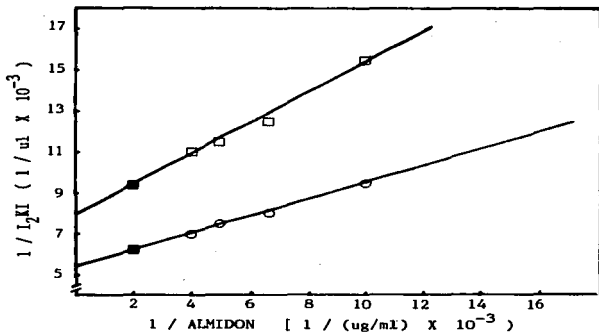


Fig. 3f- Gráfica del inverso de la cantidad de yodo vs el inverso de la cantidad de almidón para obtener una saturación del 85 % o el 90 %. En la figura se observan los inversos de la cantidad de yodo requerido para saturar al 85 % (□) o al 90 % (○) una cantidad de almidón, señalado en como inverso del almidón. Se muestra también el inverso de la cantidad de yodo que debe agregarse para saturar 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de almidón (■).

casos se obtiene el 100 % de saturación. Dada la forma de la curva, se procedió a su transformación y con ello se linearizó como se muestra en la figura 3e. Se interpoló al inverso del 85 o el 90 % de saturación, para la obtención de la cantidad de yodo requerido para su saturación a este nivel, graficando las cantidades obtenidas para cada cantidad de almidón se encuentra un comportamiento lineal (Fig. 3f), del cual se puede obtener el inverso de la cantidad de yodo requerido para saturar una cantidad determinada de almidón ya sea al 85 o 90 % de saturación. Así para 500 μg de almidón/ml, se requieren 2.43 μmoles de yodo para una saturación al 85 %, mientras que para el 90 % de saturación se requerirá de 3.703 μmoles de yodo. Lo que implica que para saturar a 500 μg de almidón/ml, es necesario agregar 10.6 o 18.1 μl de solución de I₂-KI concentrada para cada uno de los porcentajes de saturación. Debido a que la cantidad máxima de almidón ensayada es de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se usó una cantidad de saturación de 20 μl por cada mililitro de suspensión de almidón, de forma tal que la cantidad de yodo este siempre en saturación con respecto a la cantidad de almidón..

C.- DESARROLLO DE LA SEMILLA Y LOCALIZACION DEL ALMIDON

Aproximadamente a los noventa días de sembradas las plántulas, surgen los primeros botones florales y después de 10 días en promedio abren estos. En la mayoría de los casos las flores abren a las 6:00 horas y son autofecundadas. Se cierran de las 12:00 a las 14:00 horas del mismo día. Esta característica ha sido un factor importante en el estudio, ya que facilitó establecer con relativa certeza el tiempo de desarrollo. En condiciones óptimas, el desarrollo de la semilla ocurre entre 29 y 31 días hasta la obtención de semilla maduras hidratadas, pero se ha observado que, en presencia de días poco soleados el periodo de desarrollo puede prolongarse. Por otra parte cuando la temperatura es inferior a los 15 °C durante tres días

consecutivos, la planta empieza a morir. Requiere para su manutención que se le riegue cada tercer día y posea un suelo que pueda drenar. Durante los meses de Agosto y Septiembre se ha observado que las plantas dan su mayor cantidad de frutos, mientras que decrece en los meses fríos como Noviembre y Diciembre, en los que además se ha observado que aumenta la cantidad de frutos abortivos. Se ha determinado además, que las plantas sembradas en el mes de Abril son aquellas que proporcionan mayor número de frutos.

Durante los primeros días del desarrollo, el tamaño de las semillas es pequeño, por lo cual dificulta su disección, observándose que dentro de los primeros 5 días de desarrollo los pesos de los frutos no sobrepasan los 3 mg. A partir de esta fecha el fruto empieza a crecer en una forma acelerada. Una vez que las semillas pueden ser disectadas, lo cual ocurre generalmente a los 8 días de desarrollo, se muestra un incremento en el peso fresco de la semilla conforme el tiempo transcurrido de desarrollo (Fig. 4a). El comportamiento observado inicialmente un incremento de su peso a partir de los 9 o 10 días de desarrollo, siendo este muy pronunciado entre los 15 y 20 días. Posteriormente se llega a una meseta.

Se observa que los datos se ajustan a una curva de tipo sigmoide; con el fin de facilitar la interpolación de los datos, en particular en la zona en que se tiene un cambio drástico en el peso fresco con variaciones pequeñas en el tiempo de desarrollo, zona en que se requiere una mayor precisión; se decidió realizar una serie de transformaciones para su linearización. El mejor ajuste a una recta, se obtuvo cuando se el peso fresco obtenido inicialmente se transformó por el $\ln(p/p_{max}-p)$ y se graficó contra el logaritmo natural del tiempo, donde p es el peso fresco de la semilla y p_{max} es el peso máximo que puede alcanzar una semilla durante el desarrollo, considerandose que éste es de 36 mg

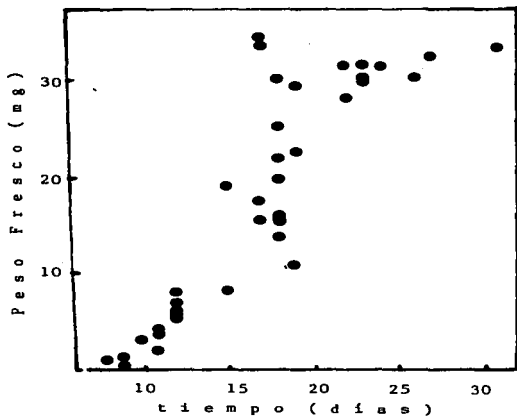


Fig. 4a- Cambios en el peso fresco de las semillas durante el desarrollo. Cada punto representa el peso de una semilla.

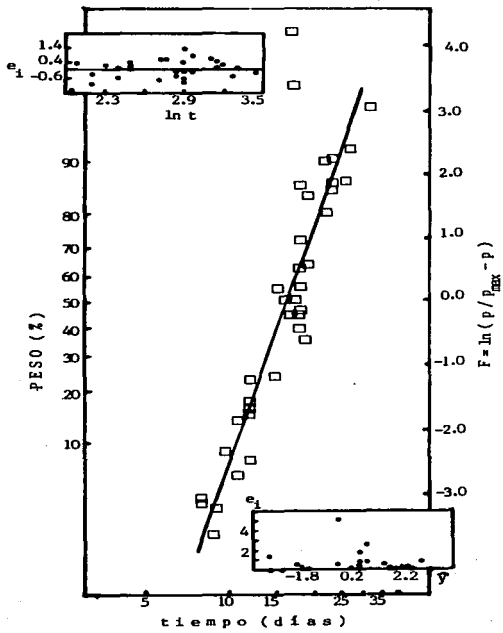


Fig. 4b- Transformación del incremento del peso fresco durante el desarrollo de la semilla. Los datos obtenidos se transformaron de acuerdo a la regresión diferencial. En los recuadros se encuentra el análisis de residuos; en el superior se muestra la gráfica de residuos contra el \ln del tiempo, análisis que sirve para comprobar la no existencia de autocorrelación; en el recuadro inferior se muestra el análisis de residuos al cuadrado vs $\ln t$ y esperada ($p/p_{\text{max}} - p$), análisis que determina la presencia de homoscedasticidad.

TABLA I- REGRESION Y ANALISIS DE VARIANZA DE LA TRANSFORMACION ENTRE EL PESO FRESCO Y EL TIEMPO DE DESARROLLO.

REGRESION

Variable Dependiente: $\ln(p/p_{max}-p)$ Variable independiente: $\ln t$				
Parámetros	Estimados	Error Std.	Valor T	Nivel Prob
Intercepto	-14.5344	0.9012	-16.1278	0
Pendiente	5.20007	0.3240	16.0467	0

ANALISIS DE VARIANZA

Fuente	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F	Nivel Prob
Modelo	124.08616	1	124.08616	257.49753	0
Error	16.86624	35	0.481893		
Total (Coor)	140.95240	36			

Coefficiente de Correlación: 0.9382

Error Estandar: 0.6941

Coefficiente de Determinación (R cuadrada): 88.03

Durbin-Watson: 2.0355

(Fig. 4b). Una característica importante que resalta en esta transformación es el tiempo medio que tarda la semilla en desarrollarse, lo cual ocurre en 17 días, según el punto de inflexión de la figura 4a, o bien el 50% del peso fresco de la figura 4b. En la Tabla I se muestra el análisis de varianza para el ajuste realizado anteriormente. En el se observa que la recta posee un índice de determinación alto, el cual es de 88.03 %, siendo significativas tanto la pendiente como la ordenada al origen; y no existiendo autocorrelación como lo demuestra el índice de Durbin-Watson y que es confirmado al graficar los residuos vs el tiempo de desarrollo, observándose que no existe un patrón de comportamiento (Fig. 4b). También se demuestra que el modelo planteado anteriormente es homoscedástico, como se observa al graficar los residuos al cuadrado vs la y esperada teniendo en cuenta que los datos poseen un comportamiento azaroso indicando que existe homoscedasticidad, que es confirmada por el índice de Park (Fig. 4b). Por lo anterior, se puede observar que los datos se ajustan a una curva sigmoide, la cual puede ser convertida a una recta mediante la transformación presentada anteriormente, el cual es un buen modelo predictivo del incremento en peso fresco conforme transcurre el tiempo de desarrollo.

El estudio del desarrollo embrionario demuestra que durante las primeras 24 horas se realiza la doble fecundación y que en la subsecuentes horas podemos encontrar un proembrión (Fig. 5a). Las pruebas histoquímicas muestran que a las 48 horas postantesis se encuentra una cantidad considerable de almidón, tanto en el parénquima del tegumento como de la pared del ovario. Para los 10 días de desarrollo, el embrión adquiere la forma de corazón (Fig. 5b), en donde se aprecian los primordios de los cotiledones. También puede observarse la presencia de un suspensor. El almidón se encuentra localizado exclusivamente en el parénquima del tegumento (Fig. 5c). A partir de esta etapa se inicia el incremento en el peso de la semilla (Figs. 4a y 4b), lo cual se ve correlacionado con el crecimiento que se observa en el crecimiento del embrión, principalmente en los cotiledones. Para los 13 días

de desarrollo, el almidón se presenta únicamente en el parénquima del tegumento, no existe este polisacárido en las capas restantes de la testa como la epidermis y subepidermis o el esclerenquima (Figs. 5d y 5e). Es importante señalar, que dentro del parénquima del tegumento se encuentra un haz vascular, como se ve en la figura 5d. Asociado a los granos de almidón puede distinguirse una cantidad de proteína. Se observa además que en los estratos más internos del parénquima están desprovistos de almidón. Ya para los 15 días de desarrollo, el embrión adquiere la forma de torpedo (Fig. 5f). En esta figura se puede apreciar la proporción que ocupa el embrión con respecto a las demás estructuras que componen la semilla, observase que los cotiledones han iniciado su expansión y todavía se puede ver el suspensor. El parénquima del tegumento en esta etapa, sigue ocupando una gran proporción de la semilla y es la única estructura que posee almidón, como se ve al observar las figuras 5g y 5h. Para esta etapa de desarrollo se puede notar más claramente que los estratos internos del parénquima del tegumento se encuentran desprovistos de almidón (Fig. 5h). Acompañando al almidón se encuentra una cantidad considerable de proteína, la cual pudiera estar involucrada en la síntesis o degradación del almidón. El embrión a los 15 días postantesis presenta ya un epicotilo y un proembium (Fig. 5i). El cuerpo del embrión no contiene almidón (Fig. 5i), tampoco los cotiledones, ni el endospermo, en comparación con el parénquima del tegumento que da una tinción intensa con el reactivo de lugol (Fig. 5j). Conforme transcurre la expansión del embrión, desplaza el endospermo. Durante esta etapa se encuentra en los cotiledones una serie de estructuras denominadas laticíferos (Fig. 5k). El parénquima del tegumento se reduce considerablemente, para los 26 días de desarrollo la cantidad de almidón que se encuentra es mínima, y queda confinada a los pocos estratos que forman el parénquima (Fig. 5k). Para finalizar el desarrollo o sea entre los 29 y 31 día postantesis, el parénquima del tegumento es sumamente reducido y se pueden distinguir fácilmente los tricomas derivados de la epidermis, la subepidermis y el esclerenquima, los cuales se encuentran

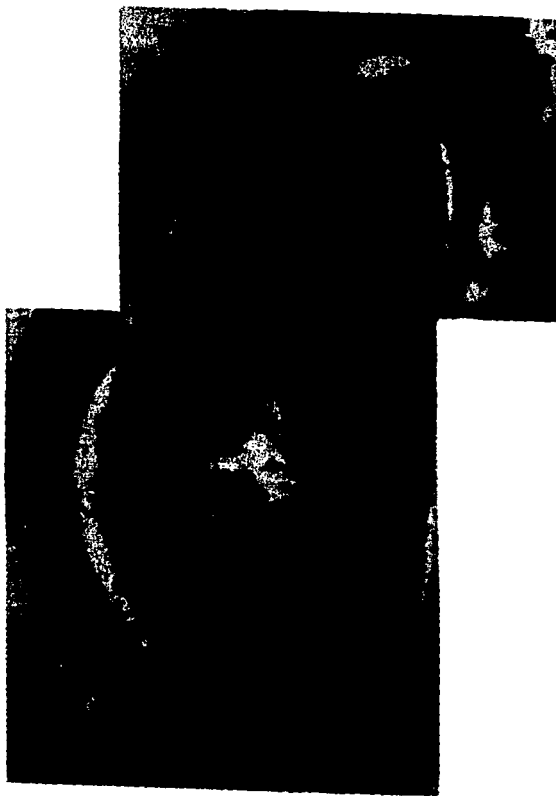


Fig. 5a- Estado de desarrollo de la semilla a las 48 horas después de la antesis. Teñida con lugol. 20 X. PE= proembrión, Pov= pared del ovario, PT= parénquima del tegumento, Sa= saco embrionario



Fig. 5b- Embrión de 10 días de desarrollo. Contraste de fases. 20 X. CE= cuerpo del embrión, C= cotiledón, S= suspensor, PT= parénquima del tegumento.

Fig. 5c- Embrión de 10 días de desarrollo teñido con lugol. 20 X. A= almidón, CE= cuerpo del embrión, S= suspensor, PT= parénquima del tegumento.

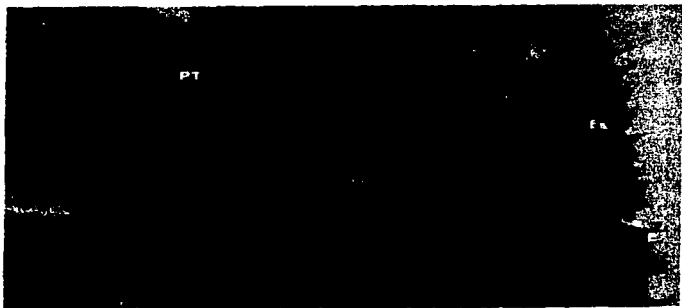


Fig 5d- Región del parénquima del tegumento de una semilla de 13 días de desarrollo: proteínas. Teñida con azul brillante de Coomassie. 32 X. A= almidón, Hv= haz vascular, PT= parénquima del tegumento.

Fig. 5e- Región del parénquima del tegumento de una semilla de 13 días: almidón. Teñida con lugol y azul brillante de Coomassie. 32 X. A= almidón, PT= parénquima del tegumento, To= capas de la cubierta seminal sin incluir al parénquima.



Fig. 5f- Corte de una semilla en desarrollo a los 15 días. Contraste de fases. 3.2 X. E= embrión, En= endospermo, Pt= parénquima del tegumento, To= capas de la cubierta seminal sin incluir el parénquima del tegumento.

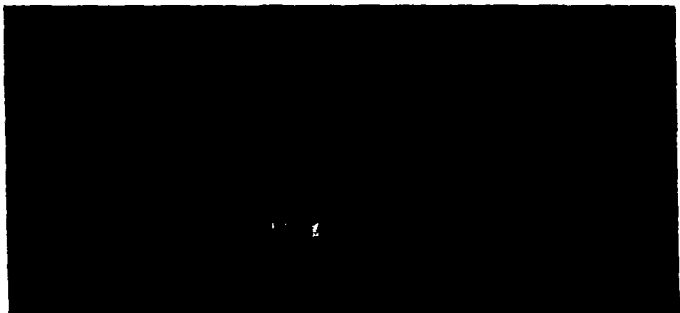
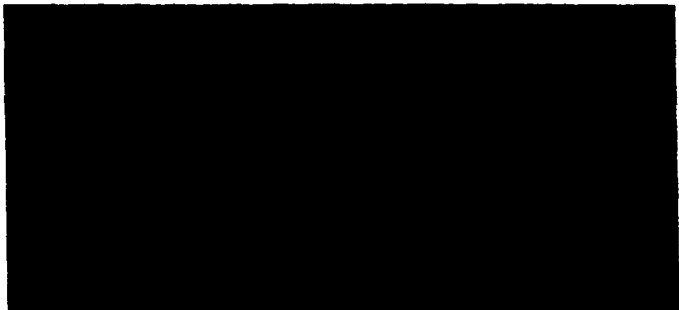


Fig. 5g- Localización de proteínas en una zona del parénquima del tegumento de una semilla de 15 días de desarrollo. Tefida con azul brillante de Coomassie. 32 X. A= almidón, Pr= proteína, PT= parénquima del tegumento, To= capas de la cubierta seminal sin incluir al parénquima.

Fig. 5h- Localización del almidón dentro del parénquima del tegumento de una semilla de 15 días de desarrollo. Tefida con lugol. 32 X. A= almidón, PT= parénquima del tegumento, To= capas de la cubierta seminal sin incluir el parénquima.

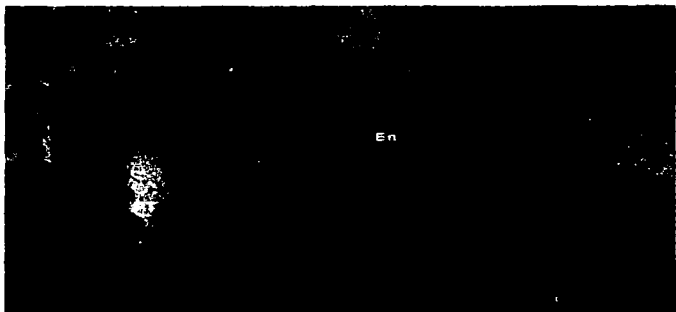
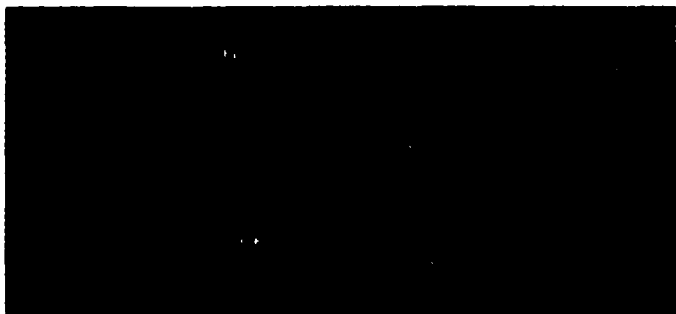


Fig. 5i- Cuerpo del embrión a los 15 días de desarrollo. Teñido con lugol. 32 X. C= cotiledón, CK= cuerpo del embrión, Ep= epicotilo, Pc= procambium, S= suspensor.

Fig. 5j- Cotiledón y parénquima del tegumento a los 15 días de desarrollo. Teñida con lugol. 32 X. A= almidón, C= cotiledón, En= endospermo, PT= parénquima del tegumento

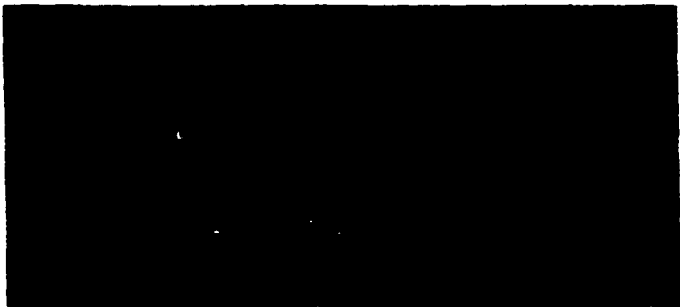


Fig. 8k- Cotiledón y parénquima del tegumento a los 25 días de desarrollo. Teñido con lugol. 32 X. A= almidón, C= cotiledón, L= laticífero, PT= parénquima del tegumento, To= capas restantes de la cubierta seminal.

desprovistos de almidón. Mientras que el embrión ocupa gran parte del espacio de la semilla, aunque se conserva algo del endospermo.

D- CANTIDAD DE ALMIDON DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA.

Durante las primeras etapas del desarrollo, donde la semilla no se puede separar del resto del fruto, la cantidad de almidón que se encuentra por semilla es relativamente baja (Fig. 6a). Posteriormente cuando la semilla puede ser disecada del fruto, lo que ocurre a partir de los 8 días tenemos que la cantidad del polisacárido es semejante al que se encuentra inicialmente en los frutos completos. Conforme transcurre el tiempo de desarrollo la cantidad de almidón se incrementa llegando a sus valores máximos entre los 17 y 19 días postantesis. En seguida se inicia un decremento en el almidón que abarca de los 19 hasta los 24 días de desarrollo. En los días subsecuentes se observa un ligero descenso hasta los 31 días, dicho decremento es mucho menos marcado que el existente entre los 19 y 24 días. Hay que hacer mención que la etapa de ascenso en la cantidad de almidón (8 a 17-19 días) va también acompañada de un incremento en el peso de la semilla (Figs. 4a y 6a), mientras que el notable descenso en la cantidad del polisacárido (19 a 24 días) va acompañado por un incremento en peso el cual es muy marcado (Figs. 4a y 6a). Si en lugar de utilizar el tiempo postantesis, se selecciona el cambio que ocurre en el peso fresco durante el desarrollo de la semilla y se relaciona a ellos la cantidad de almidón, se puede observar dos etapas: la primera de ascenso que ocurre hasta que la semilla ha alcanzado los 20 mg; y la segunda o de descenso, que se realiza a partir de los 20 mg (Fig. 6b). Al realizar una interpolación del peso fresco en el que se obtuvo el valor máximo de almidón (Fig. 4b) observamos que 20 mg de peso fresco corresponde a una etapa de desarrollo de una semilla de 17 días, lo cual coincide con lo observado en la figura 6a. Hay que hacer notar que existe un pequeño grupo de datos (17, 18, 19 días de desarrollo) en que

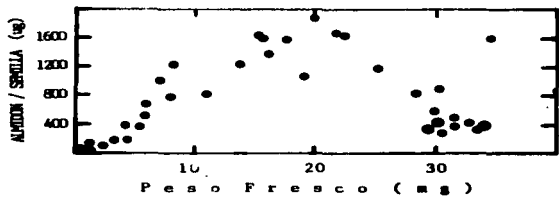


Fig. 6a- Cantidad de almidón durante el tiempo transcurrido en el desarrollo de la semilla de *Ipososa purpurea*. En la figura se muestra en el primer recuadro, la cuantificación del almidón realizada de los 0 a los 5 días de desarrollo, al utilizar el fruto completo. En el segundo recuadro se observa la cantidad este polisacárido en la semilla líder de cada fruto. (●) representa la cantidad de almidón por semilla, (○) casos que se salen del comportamiento general.

Fig. 6b- Cambios en la cantidad de almidón con respecto al incremento de peso fresco durante el desarrollo de la semilla de *Ipososa purpurea*. En esta gráfica se muestran los resultados obtenidos al cuantificar el almidón conforme se incrementa el peso fresco de la semilla durante el desarrollo. (●) representa la cantidad de almidón de la semilla líder, (●) representa los puntos que en la figura 7a se salen del comportamiento.

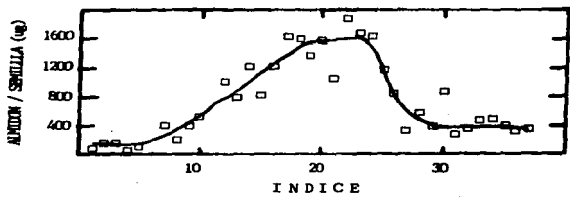
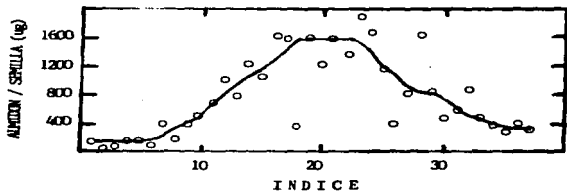


Fig. 6c- Suavización con base en el tiempo. La figura muestra la suavización según Tukey (1977) al ordenar los datos en orden creciente de acuerdo al tiempo.

Fig. 6d- Suavización con base en el peso fresco. La figura muestra la suavización según Tukey (1977) al ordenar los pares de datos de acuerdo al incremento en peso fresco.

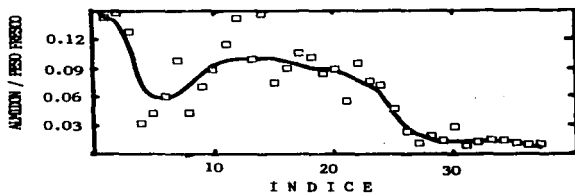
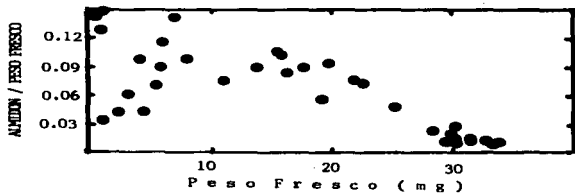


Fig. 6e- Cambio en la relación almidón/peso fresco durante el desarrollo de la semilla. En la figura se muestra los cambios en la relación de almidón/peso fresco durante el desarrollo de la semilla, al tomar este como los cambios en el peso fresco.

Fig. 6f- Suavización de la relación almidón/peso fresco durante el desarrollo de la semilla. Se realizó la suavización de los datos obtenidos en la figura 7e.

la cantidad de almidón que contienen es inferior a la esperada para ese tiempo de desarrollo, observando sus peso fresco se ve que estos son superiores a los de las semillas de esa edad, y cuando se grafican la cantidad de almidón con respecto al peso fresco, se distingue que esos datos coinciden en peso y cantidad a etapas más desarrolladas (Figs. 6a y 6b).

Para confirmar las observaciones antes descritas se decidió utilizar la técnica de la suavización. En las figuras 6c y 6d se muestran los resultados obtenidos, en la primera el ordenamiento de los pares de datos se realizó en orden creciente respecto al tiempo de desarrollo, mientras que en la segunda se utilizó el incremento en peso fresco. Como se observa en ambas figuras, se tiene una representación gráfica en que la cantidad de almidón se incrementa inicialmente y llega a establecerse un *plateau*, para posteriormente decrecer conforme la variable independiente aumenta. La suavización realizada con base en el tiempo, muestra que la meseta se encuentra entre 17 y 18 días, y la figura es simétrica (Fig. 6c). En cuanto a la suavización en que se emplea el peso fresco, se observa una distribución menos simétrica que la anterior, y la meseta corresponde a un peso que fluctúa entre 15.8 a 22.7 mg. los cuales corresponden a un desarrollo de 17 a 19 días (Fig 6d). De forma que las observaciones realizadas en el párrafo anterior son confirmadas por medio de la técnica de suavización.

Al realizar un análisis de la relación existente entre la cantidad del almidón/peso fresco durante el desarrollo (Figs. 6e y 6f), se observa que en las semillas con un peso inferior o igual a 1.1 mg, la proporción presenta un valor máximo. Un ligero aumento en el peso trae como consecuencia un decremento en dicha proporción. Conforme se incrementa el peso la relación almidón/peso fresco crece y llega al segundo valor máximo cuando el peso es de 7 a 8 mg. Posteriormente esta proporción empieza a disminuir ligeramente hasta los 20 mg, donde del decremento se hace más pronunciado y se llega a un mínimo cuando la semilla

alcanza la etapa de semilla madura hidratada. El primer máximo en la relación almidón/peso fresco se encuentra entre los 8 y 9 días de desarrollo, mientras que el segundo máximo corresponde a 12 a 15 días de desarrollo. De forma tal, que cuando el desarrollo transcurre, la semilla acumula almidón simultáneamente a que crece, la mayor proporción de almidón con respecto al peso fresco se alcanza entre los 12 y 15 días; cuando el embrión inicia su expansión, la proporción disminuye ligeramente, hasta que sobrepasa los 20 mg que equivale a los 17 días de desarrollo, donde se inicia un decrecimiento más pronunciado en dicha proporción, lo cual se correlaciona con el crecimiento acelerado del embrión y principalmente de los cotiledones (Figs. 4a y 6a).

Por lo que podemos resumir el desarrollo de la semilla en relación a la cantidad de almidón de la siguiente forma:

- I) Fase inicial comprendida entre 0 y 7 días de desarrollo en donde no es posible la obtención de la semilla y por lo tanto la cuantificación del almidón incluye tanto a la semilla en formación como a la pared del ovario.
- II) Fase de incremento en la cantidad de almidón, donde el tamaño de las semillas es muy pequeño pero es posible su disección, esta etapa abarca desde los 8 a los 13 días de desarrollo.
- III) Fase de máxima cantidad de almidón, que incluye al punto de máxima cantidad de almidón y que va desde los 14 a los 22 días de desarrollo.
- IV) Fase de decrecimiento en la cantidad de almidón comprendida entre los 23 y 26 días.
- V) Fase final del desarrollo que se encuentra entre los 24 y 31 días postantesis, donde la cantidad de almidón es mínima..

E. ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LOS POLISACARIDOS.

De las muestra extraídas durante el desarrollo, se obtuvieron los espectros de absorción entre los 400 y los 700 m μ . Los resultados obtenidos muestran que poseen una absorbancia máxima a

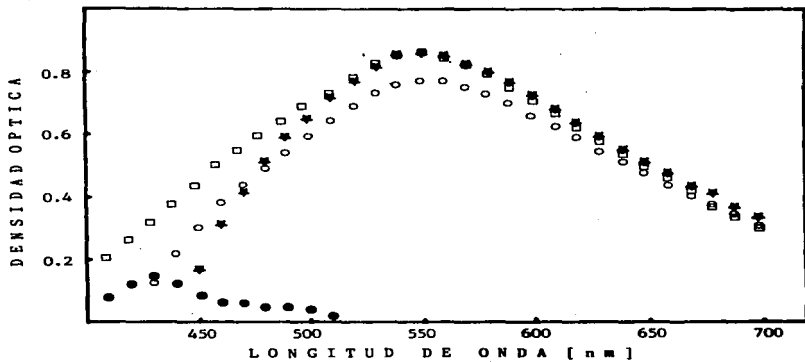


Fig. 7- Espectros de absorción de las muestras extraídas durante el desarrollo de la scalla de *Iposoa purpurea*. En la figura se muestra los espectros de absorción de los extractos enriquecidos de almidón a los: 12 (*), 15 (○) y 18 días de desarrollo (□), así como el espectro de absorción del galactomanano (●) el cual fue donado por la M. en C. Alicia Brechu F.

los 560 nm, no se observa ningún cambio de este valor durante el desarrollo, así como en el intervalo entre 560 y 700 nm. Por lo que corresponde al intervalo entre los 400 y 560 nm, existen diferencias en cuanto a la pendiente en la absorbencia, las fracciones de menor edad son las que ascienden con una pendiente mayor en este intervalo, mientras que las de mayor edad pueden presentar un hombro hacia los 400 nm (Fig. 7). Con el fin de determinar que polisacárido pudiera estar produciendo este efecto, se decidió obtener el espectro de absorción del galactomanano, en donde se muestra que su mayor absorción se encuentra a los 430 nm en presencia de I₂-KI, zona en que se localizan los hombros en los espectros de absorción de las semillas de *Ipomoea purpurea*.

F- ACTIVIDAD AMILOLITICA DURANTE EL DESARROLLO.

De acuerdo a la cantidad de almidón obtenido durante el desarrollo de la semilla de *Ipomoea purpurea*, se determinaron cinco fases en el desarrollo, los cuales son utilizados para la cuantificación de la actividad amilolítica. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8. Se obtuvieron las actividades a dos pH: 6.0 y 4.8. En cada una de ellas se señala la actividad total, termestable o actividad obtenida calentado el extracto a 70 °C durante 20 minutos y la actividad de la fracción termolábil que se obtuvo por la diferencia entre la actividad total y la actividad termestable, lo cual se realizó con el fin de tratar de inspeccionar la presencia de α amilasa y de β amilasa en los extractos enzimáticos.

Observando la actividad amilolítica a pH 6.0, tenemos que la actividad total en la primera fase del desarrollo o sea entre los 0 a 7 días, posee una actividad considerable, hay que tomar en cuenta que la actividad obtenida pertenece al fruto completo, es decir al ovario con la semilla en formación. En la segunda fase del desarrollo o fase de incremento en la cantidad de almidón, la actividad amilolítica total es menor que en la etapa inicial del

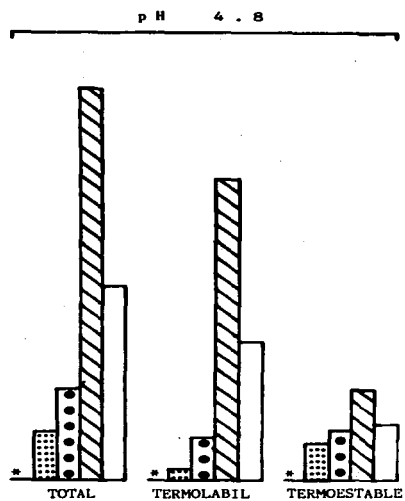
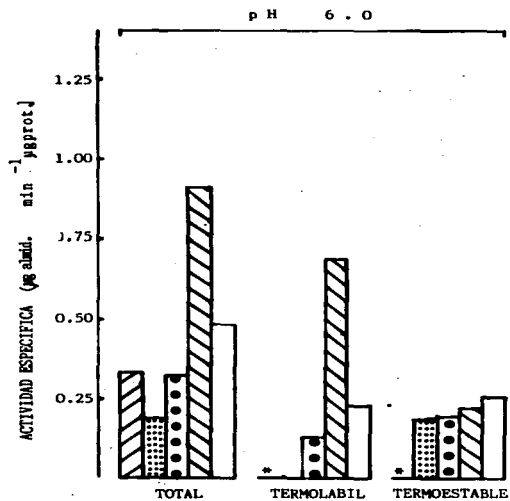


Fig. 8- Actividad amilolítica obtenida durante el desarrollo de la semilla. La figura muestra las actividades específicas obtenidas a dos pH: 4.8 y 6.0, en donde se determinó la actividad en cinco fases de acuerdo a la cantidad de almidón que presenta. Para cada pH se determinó la actividad específica; total, termestable y termolabil.

desarrollo. A partir de esta segunda etapa se inicia un incremento en la actividad amilolítica llegando a su valor máximo en el intervalo entre los 23 y lo 26 días de desarrollo que coincide con la fase de decremento en la cantidad de almidón. Por último se observa un ligero decremento en la actividad entre los 27 a 31 días de desarrollo (Fig. 8). Por otra parte cuando se determina la actividad de la fracción termolábil, se observa que posee el mismo comportamiento que la actividad total, teniendo que la máxima actividad se encuentra entre los 23 a 26 días postnatales y decrece al final del desarrollo. Con la actividad termolábil se ve que conforme avanza el desarrollo aumenta pero en una medida muy discreta y tiene su valor máximo entre los 27 y 31 días de desarrollo. Hay que hacer notar que de 8 a 13 días de desarrollo, la actividad amilolítica que se detecta es prácticamente termolábil, y que a partir de esta fase se empieza a incrementar en forma apreciable la actividad termolábil.

Los resultados obtenidos para el pH 4.8, muestran que la actividad total se incrementa conforme el desarrollo transcurre llegando a un valor máximo de los 23 a 26 días, para posteriormente decrecer al final del desarrollo (Fig. 8). El patrón presentado por la actividad a pH 4.8 es muy similar al de pH 6.0, aunque la actividad específica es mayor para el pH más ácido. La actividad termolábil y termolábil para este pH refleja el comportamiento de la actividad total, obteniéndose el valor máximo en el periodo entre los 23 y 26 días de desarrollo.

En la Tabla II se observa que de los 8 a los 22 días predomina la actividad a pH 6.0 sobre la de pH 4.8 y que posteriormente entre los 23 y 31 días postnatales es mayor la actividad total a pH 4.8 sobre la de pH 6.0. Al hacer una comparación en las actividades específicas para cada pH en un lapso determinado del desarrollo, se observa que en la fracción termolábil siempre es mayor a pH 6.0 siempre y cuando no se involucre al periodo de 23-26 días de desarrollo, donde es mayor la actividad a pH 4.8. Por su parte la fracción termolábil a pH

6.0 siempre es menor o igual que la misma fracción a pH 4.8.

Al hacer un análisis más profundo sobre las fracciones termestable y termolábil a ambos pH, se obtienen los valores porcentuales de cada una de ellas como se muestra en la Tabla III. Como se observa a pH 6.0, la proporción en las actividades termestable/termolábil posee una tendencia a disminuir entre los 8 y 26 días de desarrollo, pasando de una actividad preponderantemente termestable a una actividad de tipo termolábil. Al final del desarrollo (23-31 días) la proporción es ligeramente favorable hacia la enzima termestable. Hay que hacer notar que el valor máximo de actividad amilolítica (23-26 días) la mayor proporción de enzima es de tipo termolábil (75.6%). Ahora bien, cuando se observa las proporciones entre las dos fracciones enzimáticas a pH 4.8, se tiene que dicha proporción posee una tendencia a disminuir conforme transcurre el tiempo de desarrollo, y se llega a un valor mínimo en el período de 23 a 26 días. Posteriormente la proporción sufre un ligero aumento.

G. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FOSFOROLITICA DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA.

La actividad de la fosforilasa del almidón, se realizó en las cinco etapas que se dividió el desarrollo de acuerdo a la cantidad de almidón. Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la semilla, se muestran en la Tabla III.

Se observa que en la etapa de desarrollo entre los 23 y 31 días postantesis se presenta la actividad fosforolítica. No observándose ésta durante las primeras fases del desarrollo. Comparando estos resultados con la cantidad de almidón, tenemos que la mayor actividad fosforolítica se presenta cuando disminuye la cantidad de almidón y el parénquima del tegumento se reduce hasta que llega a formar una serie de capas de la testa de la semilla. Este máximo de actividad coinciden con las etapas de

Mayor actividad anilolítica..

TABLA II- Comparación de la actividad amilolítica medida a dos pH.

tiempo	total	termoestable	termolabil
0-7			
8-13	6 mayor 4.8	6 mayor 4.8	6 mayor 4.8
14-22	6 mayor 4.8	6 mayor 4.8	6 igual 4.8
23-26	6 menor 4.8	6 menor 4.8	6 menor 4.8
27-31	6 menor 4.8	6 mayor 4.8	6 menor 4.8

TABLA III- Proporción de la actividad amilolítica en diferentes pH.

tiempo (dias)	termoestable (%)	termolabil (%)	termoestable termolabil
pH 6.0			
8-13	98.51	1.49	68.11
14-22	59.28	40.78	1.45
23-26	24.36	75.64	0.32
27-31	52.65	47.35	1.11
pH 4.8			
8-13	77.08	22.92	3.35
14-22	54.04	45.96	1.17
23-26	23.25	76.75	0.30
27-31	29.17	70.83	0.41

TABLA IV- Actividad de la fosforilasa del almidón en semillas en desarrollo.

tiempo (días)	actividad específica ($\mu\text{mol Pi}/\text{min } \mu\text{g prot}$)
0-7	0.00000
8-13	0.00000
14-22	0.00000
23-26	0.00597
27-31	0.00596

VI- DISCUSION.

Desde el punto de vista del desarrollo de la semilla, podemos encontrar varias etapas durante este proceso. La primera, en que los cambios que se dan en el peso fresco son mínimos durante la formación del embrión, lo que ocurre entre los 0 y 8 días de desarrollo. Una segunda etapa, que se caracteriza por un considerable incremento en peso fresco, donde se observa el aumento en tamaño del embrión, principalmente de los cotiledones. En esta etapa se realiza la acumulación y removilización del almidón del parénquima del tegumento. Al final de la segunda etapa, nos encontramos con una semilla madura hidratada, lapso que ocurre entre los 9 y 31 días después de la antesis. La tercera etapa (la cual no fue estudiada) o de postmaduración, en la que sufre una deshidratación, para darnos al final una semilla madura deshidratada. Estas tres etapas han sido descritas en forma semejante para *Pisum sativum* L. cv Finalo, en que la primera etapa se realiza de los 0 a los 10 días de desarrollo. La segunda etapa o de expansión del embrión, comprende de los 11 a los 30 días postantesis, en donde se realiza la acumulación del almidón, y se caracteriza por un incremento considerable en peso fresco. Mientras que la tercera etapa, o de postmaduración, donde la semilla se deshidrata, ocurre en los siguientes 10 días (Bain y Mercer, 1966; Flin y Pate, 1968; Rochat y Boutin, 1969).

El parénquima del tegumento de *Ipomoea purpurea* existe un haz vascular que recorre toda esta estructura. En forma similar ha sido descrito un haz vascular en el caso del chícharo (Hardham, 1976). La función ha sido ampliamente documentada, a favor de un transporte de nutrientes hacia el parénquima del tegumento (Thorne, 1960, 1965; Murray, 1968). En forma análoga como lo hace en las leguminosas, el haz vascular en el parénquima del tegumento en la semilla en desarrollo de *Ipomoea purpurea* debe de estar proporcionando los nutrientes requeridos para el desarrollo.

Tanto para el chícharo (Rochat y Boutin, 1969) como para el

frijol (Wolszinkel y Amerlaan, 1965) se ha descrito que ocurre una acumulación de almidón conforme transcurre el desarrollo de la semilla, siendo depositado en los cotiledones. La soya por su parte, acumula éste polisacárido inicialmente en los cotiledones, para posteriormente ser consumido. En esta misma especie se ha detectado una cantidad de almidón en las células de la epidermis y de la hipodermis, y se ha demostrado que el almidón que ahí se encuentra, no está involucrado con el grado de crecimiento de la semilla (Thorne, 1960, 1961; Feder y Koeller, 1965). En el caso de *Ipomoea purpurea*, el almidón es depositado en forma semejante a como se realiza en la semilla en desarrollo de soya, donde la cantidad máxima se encuentra a la mitad del desarrollo, pero a diferencia de ésta se encuentra en el parénquima del tegumento. Lo anterior es confirmado, tomando cuenta que la síntesis de almidón es a partir de la ADF-glucosa proveniente de la hidrólisis de la sacarosa (Preiss, 1962). Se conoce que en este proceso se encuentran involucradas varias enzimas, entre las que participan la sacarosa sintetasa, y la UDP-glucosa pirofosforilasa. Ambas enzimas han sido encontradas en cotiledones en desarrollo de frijol (Hawker, 1971) y en embriones en desarrollo de chícharo (Edwards y ap Rees, 1966a,b) lugar donde se encuentra la acumulación del almidón. No se ha encontrado actividad de estas dos enzimas en cubierta seminal de alguna leguminosa (Murray, 1966). En el caso de *Ipomoea purpurea* podemos suponer que en el parénquima del tegumento debe de encontrarse una apreciable actividad de estas enzimas dado la cantidad de almidón que en ella se encuentran.

Durante el desarrollo, los cambios observados en la cantidad de almidón, van asociados a las transformaciones que ocurren en el parénquima del tegumento. La desaparición del almidón del parénquima, aparentemente se realiza de la capa más interna hacia la más externa de esta estructura, como se observa al comparar las diferentes etapas del desarrollo. Pudiendo implicar que primero es trasladado el almidón que se encuentra más cercano al saco embrionario, para posteriormente el que se encuentra más alejado

de éste. Si el almidón es movilizado del parénquima del tegumento hacia el saco embrionario, debe ser transformado a un carbohidrato de fácil transportación, el cual pudiera ser sacarosa o en su caso glucosa, como ha sido demostrado para diversas leguminosas (Thorne, 1985; Wolswinkel y Ammerlaan, 1985; Wolswinkel y de Reutier, 1985). En etapas tardías del desarrollo, cuando la cantidad de almidón es mínima, el parénquima del tegumento se va reduciendo, para que al final, únicamente se observe una estructura fibrosa.

En el caso de la semilla de *Ipososa purpurea*, la acumulación del almidón en la pared del ovario, así como en el parénquima del tegumento, representa una probable ventaja, pues posibilita al embrión en desarrollo, el poseer una fuente constante de carbohidratos, independiente de la planta madre. El contenido de este polisacárido, que se encuentra en el parénquimas del tegumento, previo a la expansión y maduración del embrión, puede posibilitar a la semilla en desarrollo, el obtener a corto plazo la independencia necesaria del fruto y sostener el crecimiento y desarrollo del embrión. De forma tal que este sea un mecanismo que interviene en la alta producción de semillas que caracteriza a las arvenses. Algunos estudios semejante se han realizado en leguminosas, en especial en el frijol el cual demuestra que las sustancias de reserva acumuladas en la pared del fruto, son redistribuidas a las semillas en desarrollo. Esta redistribución de carbohidratos es la suficiente para sostener el desarrollo y crecimiento de las semillas una vez que el fruto ha sido separado de la planta madre. Lo cual indica la capacidad del fruto para regular de cierta manera los procesos de desarrollo, maduración y senescencia, independiente de las influencias de la planta madre (Fountain et al, 1989)

De acuerdo a los resultados encontrados, el almidón es acumulado en una fase inicial del desarrollo, para posteriormente decrecer a una cantidad mínima cuando el crecimiento del embrión, principalmente los cotiledones, se hace evidente y de

forma acelerada. El decremento coincide con un aumento en la actividad amilolítica y fosforolítica. La semilla en desarrollo consume este almidón, ya sea para el crecimiento del embrión y/o para su transformación en otras sustancias de reserva, como lo hace la soya (Yazdi-Samadi et al. 1977; Adams et al. 1980; Bowley et al. 1983).

Los patrones de absorción de las fracciones de almidón obtenidas en las diferentes etapas del desarrollo muestran ser semejantes, presentando un máximo de absorberencia a los 560 nm, y su comportamiento siendo idéntico entre los 560 y los 700 nm, no así entre los 400 y 560 nm. Las ligeras diferencias se encuentran correlacionadas con el tiempo del postantesis, observándose que conforme transcurre el desarrollo, se opurifica otro polisacárido que en presencia de yodo de una coloración café-amarilla, y que absorbe en la región de los 400 nm. Se sabe que en semillas maduras dentro del mismo género (*Ipomoea surocoides*) existe una considerable cantidad de galactomanano (Brechu et al en prensa), y que este puede reaccionar con el yodo y da una absorbencia en la región de los 400 nm. Los patrones de absorción para todos los almidones obtenidos de semillas en desarrollo son similares en la región de máxima absorción, por lo que podemos suponer que las proporciones amilosa/amilpectina durante el desarrollo no se modifican drásticamente. Lo anterior ha de ser confirmado por otras métodos más sensibles.

En en cuanto a la actividad amilolítica determinada a pH 6.0, podemos observar que en la etapa de 0 a 7 días de desarrollo, la presencia de las amilasas se determinó en el fruto completo, mientras que para las etapas subsecuentes la presencia de actividad pertenece únicamente a la semilla en desarrollo. De forma tal que la etapa temprana del desarrollo se puede concluir que existe tanto actividad amilolítica en el ovario como en la semilla en formación. Esto es congruente con la distribución del almidón a nivel histológico, donde se observa la existencia de este carbohidrato tanto en las paredes del ovario como en la

semilla en formación. Se observa que el incremento en la actividad amilolítica coincide con la caída en la cantidad del almidón (comparar figuras 6a y 8). Es importante resaltar, que durante el periodo de 8 a 13 días postantesis prácticamente toda la actividad amilolítica detectada es de tipo termoestable, y que durante el transcurso del desarrollo (8 a 31 días) la fracción termoestable sufre un ligero ascenso. Las variaciones observadas durante el desarrollo, se deben a las fluctuaciones dadas en la actividad termolabil. Parece ser que durante el desarrollo de la semilla permanece constante una cantidad de enzima termoestable y el aumento en la actividad dada durante el desarrollo, se deba a un recambio más rápido en la fracción termolabil.

Durante la etapa de ascenso de la cantidad de almidón, predomina la actividad total a pH 6.0 sobre la de pH 4.8, siendo ésta preponderantemente termoestable. Cuando se observa un decremento en la cantidad de almidón (etapa posterior a los 19 días) predomina la actividad total a pH 4.8 sobre la de pH 6.0, siendo mayor la fracción termolabil. Tomando en cuenta el criterio de Briggs (1967), en el que se señala que la actividad termoestable en presencia de calcio se debe a la α amilasa, donde la β amilasa es desnaturalizada; bajo estas condiciones la actividad amilolítica que se presenta durante el desarrollo de la semilla de *Ipomoea purpurea*, se debe inicialmente a una α amilasa, mientras que la segunda fase es preponderantemente a una enzima con mayor actividad a pH ácidos y que sería termolabil, la cual pudiera deberse a una β amilasa como ha sido reportado en la literatura (Briggs, 1967; Tanaka et al, 1970; Stiti, 1978; Adams, 1980; Hildebrand, 1981; Doehlert y Duke, 1983; Reddy et al, 1984). Estudios más recientes, demuestran que por debajo de pH 6.0, cuando menos una fracción de la α amilasa, puede ser inactivada (Dra. Bernal-Lugo comunicación personal; Bulpin y ap Rees, 1978; Okita et al, 1979; Okita y Preiss, 1980). Para confirmar sobre las enzimas involucradas en cada etapa, lo se requiere de un estudio el cual utilice fracciones enzimáticas más puras y de la de sustratos específicos, que permitan diferenciar claramente a la

α amilasa de la β amilasa.

En el caso de de las semillas en desarrollo de *Ipomoea purpurea*, se observa que cuando se ha alcanzado la mayor actividad amilolítica, o sea en el periodo entre los 23 y 26 días de desarrollo, existe una predominancia de un 75 % de la fracción termolabil. En comparación, en el caso de la soya, se determinó que en el máximo de actividad amilolítica, la actividad predominante es la termolabil, con un 90 % (Hildebran y Hymowitz, 1981). Lo cual nos habla de las posibles diferencias en la regulación de las enzimas que se encuentran involucradas en la hidrólisis del almidón en cada una de los sistemas estudiados.

La actividad fosforolítica en las semillas en estudio se observa en las dos últimas fracciones del desarrollo, cuando la cantidad de almidón es mínima. Por lo que esta vía puede estar participando en el catabolismo del almidón durante esta fase. En los vegetales, la participación de la fosforilasa del almidón permanece oscura a pesar de varios estudios que se han realizado. La participación de la fosforilasa en la síntesis del almidón no ha sido completamente desechado. Schneider et al (1981), Sivak et al (1981) y Suda et al (1986) proponen que la enzima puede participar en la biosíntesis del almidón. Por los resultados obtenidos en este trabajo no podemos dilucidar cual de las dos direcciones utiliza la semilla, aunque podemos suponer que es principalmente hacia el lado degradativo, pues coincide con un decremento en la cantidad del almidón y que probablemente tenga una estructura sencilla como lo han descrito para la fosforilasa del almidón en semillas en desarrollo de chícharo (Matheson y Richardson, 1976).

El ensayo por medio del cual se ha determinado la presencia de la fosforilasa del almidón ha sido ampliamente utilizado por diversos autores, en el que se utiliza a la glucosa 1 fosfato como uno de los sustratos, cuando la enzima incorpora la glucosa al almidón, libera el fósforo, y forma un enlace glucosídico entre

este nuevo residuos de glucosa y el almidón (Kobayashi y Yatsuka, 1989; Suda et al, 1986; Suda et al, 1987). Otras enzimas pueden hacer uso de éste sustrato como puede ser la fosfatasa de la glucosa 1 fosfato, la cual es inhibida por el NaF, el cual se agrega tanto al amortiguador de extracción y de ensayo. Por otra parte, otra vía que puede estar involucrada es la de transformación de la glucosa 1 fosfato a maltosa 1 fosfato y de ahí ser utilizado para síntesis del galactomanano, la cual hasta el momento no podemos descartarla, por lo que se sugiere continuar la investigación para determinar cual de las vías utiliza a la glucosa 1 fosfato.

Es de importancia continuar el estudio de la semilla en desarrollo de *Ipososa purpurea*, enfocado a los productos de degradación del almidón y su transformación, así como la translocación hacia las diversas partes de la semilla (embrión y/o endospermo) y posterior incorporación a otras sustancias de reserva, para que con este fin se logre conocer a fondo los mecanismos que se encuentran involucrados, los cuales le confieren una serie de ventajas adaptativas a esta arvense que le facilitan el competir exitosamente. Los resultados hasta el momento mostrados, sugieren que la acumulación del almidón y su posterior consumo, están íntimamente relacionados con el crecimiento del embrión, para poder llegar a la madurez. Por lo que el almidón cumplirá una función relevante en los procesos que lleven a la obtención de una semilla madura, aumentando las posibilidades que un mayor número de semillas alcancen esta etapa, y con ello se aumente en el suelo el número de éstas; siendo la alta producción de semillas uno de los factores que favorecen a las arvenses para competir exitosamente con los cultivos que infestan.

VII- CONCLUSIONES.

a) El desarrollo de la semilla de *Ipomoea purpurea* desde la etapa de antesis a semilla madura hidratada ocurre en un tiempo de 29 a 31 días.

b) El crecimiento de la semilla sigue un modelo de tipo sigmoidal. El crecimiento se acelera a partir de los 12 días de desarrollo. De los 15 días en adelante los cotiledones del embrión incrementan drásticamente de tamaño.

c) El almidón durante el desarrollo de la semilla se encuentra almacenada en el parenquima del tegumento, aunque en el inicio se encuentra también en las paredes del ovario.

d) La cantidad máxima de éste polisacárido se encuentra entre los 17 y 19 días de desarrollo.

e) Las reservas de almidón decrece cuando se observa histológicamente un crecimiento en el embrión, etapa entre los 19 y 31 días de desarrollo.

f) La actividad amilolítica se presenta durante todo el desarrollo. La máxima actividad se observa entre los 23 y 31 días. Inicialmente es preponderante la actividad termoestable, mientras que en la segunda fase del desarrollo la actividad mayor se debe a la fracción termolábil.

g) La actividad fosforolítica se presenta al final del desarrollo (23 a 31 días) justo cuando se alcanzan los valores máximos en la actividad amilolítica.

h) Por lo que el almidón en las semillas en desarrollo es una reserva temporal. Y su posterior utilización provee al embrión de una fuente de carbohidratos constante para su completo

desarrollo.

VIII- BIBLIOGRAFIA.

- Abdul-Hussain S., E. Varriano-Marston (1962). Amylolysis of Pearl Millet Starch and Its Fractions by Pearl Millet Alpha-Amylase. *Cereal Chem* 59(5):361-366.
- Adams C., E. Rinne, M. Fjerstand. (1960). Starch deposition and Carbohydrase Activities in Developing and Germinating Soybean Seeds. *Ann Bot* 46:577-582
- Agundis O (1964). Logros y Aportaciones de la Investigacion Agrícola en el Combate de Malezas. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. México.
- Akazawa T. (1976). Polysaccharides. En: *Plant Biochemistry*. Ed: J Bonner, J Varner. Academic Press. Nueva York. cap: 12.
- Austin D. (1976). Varieties of *Ipsocoa trichocarpa* (Convolvulaceae). *Sida*. 6(3):216-220.
- Bain J., F. Mercer (1966). The relationship of the Axis and Cotyledons in Germinating Seeds and Seedlings of *Pisum sativum* L. *Aust J Biol Sci*. 19:49-67.
- Balls A., M. Walden, E. Thompson (1946). A crystalline Amylase from Sweet Potato. *J Biol Chem*. 173:9-19.
- Banks W., D. Muir (1980). Structure and Chemistry of the Starch Granule. En: *The Biochemistry of Plants*. vol.3. Carbohydrates: Structure and Function, Ed: J Preiss. Nueva York. cap: 9.

- Batachelet E. Introduction to Mathematics for Life Science. 2 Ed. Spring-Verlag. Nueva York. cap:11.
- Balsida A., E. Varriano-Marston (1961). Pearl Millet Amylases. I. Properties of Partially Purified Alpha Amylase. Cereal Chem. 58(5):433-437.
- Berlyn G., J. Mirsche. Botanical Microtechnique and Cytochemistry. Iowa State University Press. Iowa (1976).
- Bowley J. Mobilization of Reserves. En: Physiology and Biochemistry of Seeds in relation to Germination. Ed: J. Bowley, M. Black. Spring Verlag. Berlin (1978). cap:6.
- Bowley J., D. Leung, F. Ouellette (1983). The Comparative Role of the Endo- β -mannanase, β -mannosidase and the α galactosidase in the Mobilization of Endosperm Cell Wall hemicellulose of Germinated Lettuce Seeds. En: Recent Advances in Phytochemistry. vol. 17: Mobilization of Reserves in Germination. Ed: C. Mossolillo, P. Lea, F. Loewus. Plenum Press. Nueva York. pp: 137-152.
- Bowley J., M. Black (1985). Seeds. Physiology of the Development and Germination. Plenum Press. Nueva York. cap:1 y 2.
- Bhatnagar S., B. Johri (1971). Development of Angiosperms Seeds. En: Seeds Biology. vol 1. Importance, Development and Germination. Ed: T. Koslowski. Academic Press. Nueva York. cap:3.
- Biliaderis C., P. Grant, J. Vose (1979). Molecular Weight Distribution of Legume Starches by Gel Chromatography. Cereal Chem 58:475-479.

Biliaderis C., P. Grant, J. Voss (1961). Structural Characterization of Legume Starches. I. Studies on Amylose, Amylopectin, and Beta-limit Dextrins. Cereal Chem. 58:498-502.

Birk Y., M. Waldman (1965). Amyolytic-Trypsin-Inhibiting-, and Urease Activity in three Varieties of Soybeans and in the Soybean Plant. Qual Plant Water Veg 12:200-209.

Birnbaumer L., T. Swartz (1961). Membrane Receptors: Criteria and Selected Methods of Study. In: Laboratory Methods for Hormone and Molecular Endocrinology. 5 ed. Baylor College of Medicine Tex. Med:1.

Brechú-Franco A., A. García, J. Márquez, M. Pérez, F. García. Aislamiento y Caracterización del Galactomanano de Semillas de *Turbinos corymbosa* (L) Raf. y de *Ipomoea suroccidens* Roem & Schult (Convolvulaceae). Phytón. (en prensa).

Briggs D (1964). Origin and Distribution of α Amylase in Malt. J Inst Brew 70:14-18.

Briggs D (1967). Modified Assay for α Amylase in Germinating Barley. J Inst Brew 73:361-370.

Bulpin F., T. ApRess (1978). Starch breakdown in the Spadix of *Arum maculatum*. Phytochem 17:391-396.

Burt D (1960). Basic Receptors Methods. II. Problems of Interaction in Binding Studies. In: Receptor Binding Techniques. Short Course. Syllabus. pp:63-69.

Carballo C (1986). El Cultivo del Maiz en el Bajío y zonas

Similares. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.
IAG. Circular CIAB 8:3-20.

Campbell J., J. Reid (1982). Galactomannan Formation and Guanosine 5' Diphosphate-Mannose: Galactomannan in Developing Seed of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). *Planta* 155:105-111.

Consatti C., L. Smith. La Flora Sinóptica Mexicana. 3r ed. IPN. México. (1981). pp:66-77.

Cooper D (1938). Embriology of *Pisum sativum*. *Bot Gaz* 100: 123-132.

Chapman G., J. Pallas J. Medicino (1972). The Hydrolysis of Maltodextrins by a B-amylase Isolated from Leaves of *Vicia faba*. *Biochem Biophys Acta* 276:491-507.

Chatterjee S., E. Price. Regression Analysis by Example. J Wiley. Nueva York (1977). cap:1,2.

Ching T (1972). Metabolism of Germinating Seeds. En: Physiological Ecology (A Series of Monographs, Texts, and Treatises). Vol III. Germination Control, Metabolism and Pathology Seed Biology. Ed: T. Kozlowski. Academic Press. Nueva York. cap:2.

Dausseant J., P. Coruasier. (1970). Biosynthesis and Modification of α and β Amylase in Germinating Wheat Seeds. *FEBS Lett* 7:191-194.

Davis G. Systematic Embriology of the Angiosperms. J Wiley. Nueva York. (1966).

- Doehlert D., S. Duke, L Anderson (1982). β Amylase from Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Roots. *Plant Physiol* 69:1096-1102.
- Doehlert D., S. Duke (1983). Specific Determination of α Amylase Activity in Crude Plant Extracts Containing β Amylase. *Plant Physiol* 71:229-234.
- Eaton H., J. MacLeod (1946). *The Weeds of Ontario* Department of Agriculture. Statistics and Publications Branch. Toronto. Boletin 409.
- Echars J., T. ap Rees (1986a). Sucrose Partitioning in Developing Embryos Round and Winkled Varieties of *Pisum sativum*. *Phytochem* 25:2027-2032.
- Edwards J., T. ap Rees (1986b). Metabolism of UDP Glucose by Developing Embryos of Round and Winkled Varieties of *Pisum sativum*. *Phytochem* 25:2033-2039
- Eliasson A (1966). Physical and chemical Characteristics of Legume Starches. *Atlas of Science: Animal and Plant Science*. pp:89-94.
- Enari T., T. Sopanen (1966).. Mobilization of Endospermal Reserve During the Germination of Barley. *J Inst Brew* 92:26-31.
- Enna S (1960). Basic Receptor Methods I. En: Receptor Binding Techniques. Short Course. Syllabus. pp:33-52.
- Esau K. *Anatomy of Seed Plants*. 2 ed. J. Willey. Nueva York. (1977). cap:2.
- Fader G., H. Koller (1985). Seed Growth Rate and Carbohydrate Pool

- Size of the Soybean Fruit. *Plant Physiol* 79:663-666.
- Flinn A., J Pate (1968). Biochemical and Physiological Changes During Maturation of Fruit of the Field pea (*Pisum sativum* L). *Ann Bot* 32:479-496.
- French D (1964). Organization of Starches Granules. En: *Starch Chemistry and Technology*. 2 ed. Ed: R. Whistler, J. Emiller, E. Pashall. Academic Press. Florida KUA. pp:184-247.
- Fountain D., H. Oultred, J. Holdworth, R. Thomas (1969). Seed Development in *Phaseolus vulgaris* L. cv Seminole. *Plant Physiol* 69:333-340.
- Fukui T (1963). Plant Phosphorylases: Structure and Function. En: *The New Frontiers in Plant Biochemistry*. Ed: T. Akasawa, T. Aoi, H. Imaseki. Japan Scientific Societies Press. Tokyo. pp:71-82.
- Gertler A., Y Birk (1965). Purification and Characterization of a β -amylase from Soya Bean. *Biochem J* 95:621-627.
- Govil C (1970). Morphological Studies in the Family Convolvulaceae . I. Development and Structure of the Seed Coat. *J Indian Bot Soc* 50:32-39.
- Greenwood C., A. MacGregor, E. Milne. (1965). The Amylase From Broad Beans. Purification and Properties. *Arch Biochem* 112:459-464.
- Guajarati D. *Econometria*. McGraw Hill. México (1961). pp:12-91, 184-250.

- Gubler F., A. Ashford, J. Jacobsen (1987). The Release of α Amylase Through Gibberelin Treated Barley Aleurone Cell Walls. *Planta* 172:155-161.
- Hardham A (1976). Structural Aspects of the Pathways of Nutrition Flow to the Developing Embryo and Cotyledon of *Pisum sativum* L. *Aust J Bot* 24:711-721.
- Hawker J (1971). Enzymes Concerned with Sucrose Synthesis and Transformation in Seed of Corn, Broad Bean, Castor Bean. *Phytochem* 10:2313-2322.
- Hildebrand D., T. Hymowitz (1961). Role of β amylase in Starch Metabolism During Soybean Seed Development and Germination. *Physiol Plant* 53:429-434.
- Hutson D., D. Manners (1965). Studies on Carbohydrate Metabolizing Enzymes. *Biochem J* 94:763-769.
- IBPGR (International Board Plant Genetic Resources). Genetic Resources of Seed Potato. IBPGR Secretarial. Roma. pp:20.
- Jacobsen J., J. Scandalios, J. Varner (1970). Multiple Forms of Amylase Induced by Gibberelic Acid in Isolated Barley Layers. *Plant Physiol* 45:367-371.
- Johansen D (1940). Plant Microtechnique. MacGraw Hill. Nueva York.
- Juliano B (1971). A Simplified Assay for Millet-Rice Amylase. *Cereal Sci Today* 16(10):334-340.

- Kainuma K., D. French (1971). Nagali Amylodextrin and its Relationship to Starch Granule Structure I. Preparation and Properties of Amylodextrins from Various Starch Types. Biopolymers 10:1673.
- Kaur H., R. Singh (1963). Structure and Development of Seeds in three *Ipomoea* species. J Indian Bot Soc 49:168-174.
- King L (1966). Weeds of the World. Biology and Control. Leonard Hill Books. London.
- Knutson C., J. Cluskey, F. Dintzis (1962). Properties of Amylose-Iodine Complex Prepared in the Presence of Excess Iodine. Carbohydrate Research 101:117-128.
- Knutson C (1966). A Simplified Colorimetric Procedure for Determination of Amylose in Maize Starches. Cereal Chem 63:89-92.
- Kobayashi M., M. Yatsuka (1989). Two Phosphorylases from Suspension Cultured Soybeans. Agric Chem 53(3):838-840.
- Laundry L., D. Smyth (1988). Characterization of Starch Produced by Suspension Cell Cultures of Indica Rice (*Oryza sativa* L). Plant Cell Tiss Org Cult 15:23-32.
- López-Curto L., J. Márquez-Guerra, G. Laguna-Hernandez, M. Ponce-Balazar (1990). Ciclo de Vida y Desarrollo de la Semilla de *Ipomoea x leucantha* (Convolvulaceae), Arvense del Arroz. Phyton. 51:17-24.
- Lowry O., M. Rosebrough, A. Farr, R. Randall (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J Biol Chem 193:265.

- MacGregor A., R. Thompson, W. Meredith (1974). α Amylase From Immature Barley: Purification and Properties. *J Inst Brew* 80: 161-167.
- MacGregor A (1979). Isolation of Large and Small Granules of Barley Starch and a Study of Factors Influencing the Adsorption of Barley Malt α Amylase by Granules. *Cereal Chem* 56:430-438.
- MacGregor A., J. Morgan (1984). Structure of Amylopectins Isolated from Large and Small Starch Granules of Normal and Waxy Barley. *Cereal Chem* 61(3):222-228.
- Maheswari P. (1944). The Seed Structure of *Phaseolus* a Criticism. *Sci Culture*. 9(55):557
- Maheshkari P. An Introduction to the Embryology of Angiosperms. McGraw Hill. Nueva York. (1950). cap:2.
- Manners D (1974) Some Aspects of the Enzymic Degradation of the Starch. En: Plant Carbohydrate. Ed: J. Fridham. Academic Press. Nueva York. cap:8.
- Martínez M. Plantas Medicinales de México. 5 ed. Notas. México (1969). pp:656.
- Matheson M., E. Richardson (1976). Starch Phosphorylase Enzymes in the Developing and germinating Pea Seeds. *Phytochem* 15:887-892.
- Matuda E (1963). El Género *Ipomoea* en México. I. *An Inst Biol Mex* 34:85-145.
- Matuda E (1964). El Género *Ipomoea* en México. II. *An Inst Biol Mex*

- Mauro B., T. Kobayashi (1951). Enzymic scission of the Branch Links in Amylopectine. *Nature* 167:606.
- McCleary B., M. Matheson (1974). α -D-Galactosidase Activity and Galactomannan and Galactosylsucrose Oligosaccharides Depletion in Germinating Legume Seed. *Phytochemistry*. 13:1747-1757.
- McCleary B., M. Matheson (1975). Galactomannan Structure and β -Mannanase and β Mannanase and β Mannosidase Activity in Germinating Legume Seed. *Phytochem* 14:1187-1194.
- Meir H., J. Reid (1977). Morphological Aspects of Galactomannan Formation in the Endosperm of *Trigonella foenum-graecum* L (Leguminosae). *Planta* 133:243-248.
- Miranda F (1941). Estudios Sobre la Vegetación de México. I. La Vegetación de los Cerros del Sur de la Meseta del Anáhuac, el cuajtiotal. *An Inst Biol Mex* 12:569-614.
- Miranda F (1942). Estudios Sobre la Vegetación de México. III. Notas Generales Sobre la Vegetación del Suroeste del Estado de Puebla. *An Inst Biol Mex* 13:412-450.
- Miranda F (1943). Estudios Sobre la Vegetación de México. IV. Algunas Características de la Flora y de la Vegetación de la Zona de Acatlan Puebla. *An Inst Biol Mex* 14:407-421.
- Miranda F (1947). Estudio Sobre la Vegetación de México. V. Rasgos de la Vegetación de la Cuenca del Eo de las Balsas. *Rev Soc Mex Hist Nat* 8:95-114.

- Miranda F (1980) Vegetación. En: La Isla Socorro. Monog Inst Geof Mex 2:127-152.
- Mitsui T., T. Akazawa (1988). Preferential Secretion of R-Type α Amylase Molecules in Rice Seed Scutellum at High Temperatures. Plant Physiol 82:880-884.
- Mochizuki Y., K. Furukawa (1987). Applications of Coomassie Brilliant Blue Staining to Cultured Hepatocytes. Cell Biol Inter Rep 11(5):367-371.
- Muenscher W. Weeds. 2 Ed. MacMillan. Nueva York (1965).
- Murray D. Nutrition of the Angiosperm Embryo. Wiley. Nueva York (1988). cap:6,7.
- Ohamoto K., T. Akazawa (1979). Enzymic Mechanisms of Starch Breakdown in Germinating Rice Seed. Plant Physiol 63:336-340.
- Okita T., E. Greenberg, D. Kuhn, J. Preiss (1979). Subcellular Localisation of the Starch Degradative and Biosynthetic Enzymes of Spinach Leaves. Plant Physiol 64:187-192.
- Okita T., J. Preiss (1980). Starch Degradation in Spinach Leaves. Plant Physiol 66:870-876.
- Pate J., A. Flinn (1977). Fruit and Seed Development. En: The Physiology of the Garden Pea. Eds: J. Batcliffe, J. Pate. Academic Press. Londres. pp:431-468.
- Patrick J., R. McDonald (1980). Pathway of carbon Transport Within Developing Ovules of *Phaseolus vulgaris* L. Aust J Plant Physiol 7:671-684.

- Peat S., J. Whelan, S. Pitr (1949). The Amylolytic Enzymes of Soybean. *Nature* 164:499-500.
- Ponce-Salazar M., J. Márquez-Guzmán, A. Brechó-Franco, G. Laguna-Hernández (1990). Desarrollo e Histoquímica de la Cubierta Seminal de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth (Convolvulaceae) y su Relación con la Impermeabilidad al Agua. *Phyton* 51(1):5-12.
- Pongprayoon U., L. Bohlin, P. Soonthornsaratus, S. Wasuwat (1991). Antiinflammatory activity of *Ipomoea pes-caprae* (L.). *R Br Phytoterapy Res* 5(2):23-28.
- Preiss J., C. Levi (1960). Starch Biosynthesis and Degradation. In: *The Biochemistry of Plants*. vol. 3. Carbohydrates: Structure and Function, Ed: J. Preiss. Academic Press. Nueva York. pp: 371-423.
- Preiss J (1962). Regulation of the Biosynthesis and Degradation of the Starch. *Ann Rev Plant Physiol* 33:431-464.
- Rochat C., J. Routin (1969). Carbohydrate and Nitrogenous Compounds Changes in the Hull and the Seed During the Pod Development of the Pea. *Plant Physiol Biochem* 27(6):861-867.
- Reedy L., T. Ching, R. Metzger (1984). Alpha-amylase Activity in the Wheat Kernels Matured and Germinated Under Different Temperature Conditions. *Cereal Chem* 61(3):228-231.
- Reid G (1971). Reserve Carbohydrate Metabolism in Germinating Seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (Leguminosae). *Planta* 100:134-142.

- Rzedowski J., R. McVaugh (1968). La Vegetación de Nueva Galicia. Contr Univ Mich Herb 9:1-123.
- Rzedowski J. Vegetación de México. Limusa. México (1963). pp:210-253.
- Sauer J (1967). Geographic Reconnaissance of Seashore Vegetation Along the Mexican Gulf Coast. Coastal studies Inst Louisiana St Univ Tech Rep. USA.
- Schneider E., J. Becker, D. Volkmann (1981). Biochemical Properties of Potato Phosphorylase Changes with its Intracellular Localization as revealed by Immunological Methods. Planta 151:124-134.
- Schooh T (1945). The fraction of Starch. Adv Carbohydr Chem 1:247-277.
- Sivak M., J. Tandecara, C. Carden (1981). Studies of Potato Tuber Phosphorylase Catalyzed reaction in the Absence of an Exogenous Acceptor. I. Characterization and Properties of the Enzyme Arch Biochem Biophys 212:525-536.
- Smith J. Ideas Matemáticas en Biología. CEMSA. México (1977). cap:3
- Smith A (1966). Major Differences in Isoforms of Starch-Branching Enzyme Between Developing Embryos of Round and Wrinkled Seed Pea (*Pisum sativum* L.). Planta 175:270-279.
- Sopanen T., Ch. Lauriere (1989). Release and Activity of Round B Amylase in a Germinating Barley Grain. Plant Physiol. 89:244-249.

- Stiti M., P. Bulpin, T. ap Hess (1978). Pathway of Starch Breakdown in Photosynthetic Tissues of *Pisum sativum* Biochem Biophys Acta 544:200-214.
- Stoscheck C (1990). Quantitation of Protein . Methods Enzimology 162:50-68
- Subcomité de Plantas Nocivas. Comité sobre Plagas de Plantas y Animales. Consejo de Agricultura. Consejo Nacional de Investigación: National Academic of Sciences USA. Plantas y animales. Vol: II. Limusa. México. (1982).cap:2.
- Suda M., T. Watanabe, M. Kobayashi, K. Matsuda (1986). Changes in Starch Content and Related Enzymes Activities During the Growth of Germinating Soybeans. Agric Biol Chem 50(12):3196-3198
- Suda M., T. Watanabe, M. Kobayashi (1987). Two Types of Phosphorylase from Etiolated Soybean Cotyledons. J Biol Chem 102:471-479.
- Swain E. E. Dekker (1966). Seed Germination Studies. II. Pathways for Starch Degradation in Germinating Pea Seedlings. Biochim Biophys Acta 122:87-100.
- Tanaka Y., T. Ito, T. Akazawa (1970). Enzymic Mechanism of Starch Breakdown in germinating Rice Seed. Plant Physiol 46:650-654.
- Tausky H., E. Shorr (1953). A Microcolorimetric Method for Determination of Inorganic Phosphorus. J Biol Chem 202:675-685.
- Thomas J., J. Spadlin, S. Dygert (1971). Plant and Animal

- Amylases. En: The Enzymes. Vol:3. Ed: P. Boyer. Academic Press. Nueva York. pp:115-189.
- Thorne J (1980). Kinetics of the ^{14}C Photosynthate uptake by Developing Soybean Fruit. *Plant Physiol* 65:975-979.
- Thorne J (1981). Morphology and Ultrastructure of maternal Seed Tissues of Soybean in Relation to the Import of Photosynthate. *Plant Physiol* 67:1016-1025.
- Thorne J (1985). Phloem Unloading of the C and N assimilates in Developing Seeds. *Ann Rev Plant Physiol* 36:317-343.
- Tipples K., R. Tkachuk (1965). Wheat Beta-Amylase. I. Isolation. *Cereal Chem* 42:111-124.
- Tsai C., F. Salasini, O. Nelson (1970). Enzyme of the Carbohydrate Metabolism in the Developing Endosperm of Maize. *Plant Physiol* 46:299-306.
- Tukey J. Exploratory Data Analysis. Addison-Wesley. USA. (1977). cap:7
- Van Caecele L., J. Mills, M. Sumner, R. Gillespie (1981). Cytology of Mucilage Production in the Seed Coat of Candle Canola (*Brassica campestris*). *Can J Bot* 59:282-300.
- Van Caecele L., A. Mac Gregor (1986). Alpha-amylase in the Seed Hulls of Developing *Brassica campestris*. *Can J Bot* 64:1461-1462.
- Villegas M. Malezas de la Cuenca de México. Especies Arvenases. Instituto de Ecología. Museo de Historia Natural de la Cd. de México. Publicación num. 5. México. (1979).

- Whelan W (1955). Phosphorylases from Plant. En: Methods in Enzymology (Preparations and assay of Enzymes) vol. 1. Ed: Sydney P., O. Nathan. Academic Press. Nueva York. pp:192-200.
- Wolfson M., H. Khades (1965). Chemical Evidence for the Structure of Starch. En: Starch: Chemistry and Technology. Vol:1. Ed: R. Whistler, E. Paschal. Academic Press. Nueva York. cap:10.
- Wolswinkel P., A. Amerlaan (1965). Characteristics of Sugar, Amino Acid and Phosphate Release From Seed Coat of Developing Seed of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. J Exp Bot 36:369-388.
- Wolswinkel P., H. Ruitter (1965). Amino Acid Release from Seedcoat of Developing Seed of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. Ann Bot 55:263-267.
- Woodcock E (1943). Seed Development in Morning Glory (*Ipomoea rubrocaerulea* Hook) . Paper Mich Acad Sci Art Lett 28:209-212.
- Yasdi-Samadi B., E. Rinne, E. Seif (1977). Components of Developing Soybean Seeds: Oils, Protein, Sugars, Starch, Organic Acids, and Amino Acids. Hgrom J 69:481-486.
- Yin H., C. Sun (1945). Localization of Phosphorylase and Starch Formation in Seed. Plant Physiol 24:103-110.