

24-20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

Niveles de Citocininas en Maiz

T E S I S

Que para obtener el título de

QUIMICO

presenta:

Elba Rojas Escudero

México, D. F.

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

I.	INTRODUCCION	1
II.	ANTECEDENTES	4
	A. HORMONAS VEGETALES	
	1. GIBERELINAS	6
	2. AUXINAS	8
	3. ACIDO ABCSISICO	10
	4. ETILENO	12
	5. CITOCININAS	13
	B. METODOS DE ANALISIS	
	1. ENSAYOS BIOLOGICOS	21
	2. METODOS INMUNOQUIMICOS	22
	3. CROMATOGRAFIA	24
	4. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION	25
	5. CROMATOGRAFIA DE GASES	29
	C. METODOS DE EXTRACCION	35
III.	PARTE EXPERIMENTAL	41
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	46
	RESUMEN Y CONCLUSIONES	100
	BIBLIOGRAFIA	103

I. INTRODUCCION

INTRODUCCION

El crecimiento de una planta es un proceso dinámico y complejo, aunque estrictamente controlado.

Para nosotros es familiar el notable cambio que ocurre durante el ciclo de vida de una planta, desde la germinación, la producción de fruto hasta la senescencia. Sin embargo, la sucesión ordenada de los cambios principales que ocurren desde la semilla hasta la compleja y elevada organización que presenta la planta madura, es uno de los más fascinantes y desafiantes problemas de la biología.

Existen sustancias que, en cantidades extremadamente pequeñas, promueven, inhiben o modifican de manera específica un proceso fisiológico, tanto en animales como en vegetales. A estas sustancias se les ha denominado hormonas, ya que son sintetizadas en un punto distante de su sitio de acción y, para los vegetales en particular, se les ha descrito como reguladores de crecimiento, sustancias de crecimiento o fitohormonas.

A diferencia de las hormonas animales que son más específicas, las fitohormonas tienen un intervalo más amplio de acción, dependiendo del tipo de órgano o tejido sobre el que ac-

túen.

Las fitohormonas se dividen en dos grandes grupos, uno formado por las promotoras del crecimiento, entre las que se encuentran las giberelinas, las auxinas, el etileno y las cito_ucininas; y el otro que incluye a los inhibidores del crecimiento, como el ácido abscísico y algunos compuestos fenólicos.

El objetivo de este trabajo consiste en analizar los métodos para hacer determinaciones cuantitativas de citocininas que se encuentran reportados en la literatura, y adecuarlos a la extracción y determinación de dichas fitohormonas en maíz (Zea mays).

Aunque los métodos que se encuentran reportados, están diseñados para extraer en conjunto todas las citocininas presentes en las muestras analizadas, en este trabajo solo se pudo identificar y cuantificar t-zeatina, por ser está la única citocinina de la que disponíamos de un estándar.



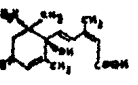
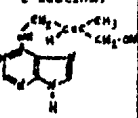
II. ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Los diferentes grupos de fitohormonas que existen hace difícil su estudio, y aunque en este trabajo el interés se centra en las citocininas, en este capítulo se mencionan brevemente los otros grupos de fitohormonas para conocerlos y saber como actúan, posteriormente se presentan los métodos conocidos para su análisis y cuantificación. Al final del capítulo se incluye un resumen breve de una selección de los métodos encontrados en la literatura para la extracción y cuantificación de citocininas.

En el siguiente cuadro se presentan los grupos de fitohormonas con sus principales características².

CUADRO No. 1

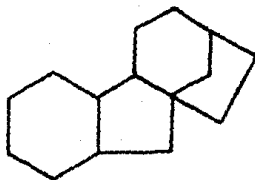
Grupo de hormona.	Ejemplo de estructura.	Otros ejemplos.	Ejemplos de acción y función biológica.	Niveles típicos (ng/g de tejido en peso fresco).	Problemas de análisis.
Giberelinas.	Giberelina A ₁ 	Más de 50 giberelinas, varían en posición del -OH y -COOH, y en el grado de insaturación.	Etiolecación del tallo, crecimiento de la fruta; inducción a las enzimas para la germinación de las semillas.	1 - 10 ³	Fácil oxidación de la molécula, gran variedad de moléculas muy semejantes (más de 50) y presencia de varios cromóforos.
Auxinas.	Acido 3-indolacético. 	Acido fenilacético, ácido 4-cloroindolacético.	Mantiene la dominancia apical; la expansión y elongación de la célula.	1 - 10 ³	Fácil oxidación y fotooxidación de la molécula.
Abscisinás.	(+)-Ácido abscísico. 	Acido fásfico.	Cierre del estoma; dormancia del embrión; inhibe muchas respuestas de las giberelinas, auxinas y citoquinas.	10 - 2 x 10 ⁴	Fácil isomerización de la configuración de los dobles enlaces.
Etileno.	Etileno. $CH_2=CH_2$	-----	Senescencia, epinastia, maduración climateria de la fruta.	-----	Volátil, contaminación con muchos plásticos y polímeros.
Citocinas.	t-zeatina. 	Isopenteniladenosina, t-zeatina ribosido.	División celular; rompimiento del capullo y dormancia de la semilla; inhibe la dominancia apical del eje principal del tallo.	1 - 10 ³	Fuertemente adsorbidas por la sílice.

II.A.1. GIBERELINAS

Estos compuestos se relacionan químicamente a los diterpenos, los cuáles son miembros de un grupo grande de compuestos que se encuentran de manera natural en plantas, y a los que se les ha llamado terpenoides¹.

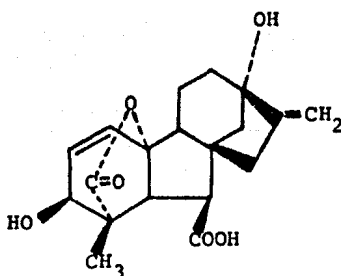
En el año de 1920, se descubrió un grupo de hormonas de crecimiento en plantas cuando un investigador japonés, trabajando sobre el "bakanae", enfermedad del arroz causada por el hongo *Gibberella fujikuroi* (también conocido como *Fusarium moniliforme*), observó una elongación excesiva del tallo y las hojas, dando por resultado una planta anormalmente alta.

Algunos metabolitos del hongo son los responsables de este efecto y se les conoce colectivamente como Giberelinas, las cuáles reciben nombres y sufijos a medida que van siendo aisladas. Su estructura básica es la del gibano (I) y solo difieren en la posición de los grupos sustituyentes en el esqueleto, así como en el grado de saturación⁴.



I

En 1939 se aisló de un medio de cultivo del mismo hongo (*Gibberella fujikuroi*) una pequeña cantidad de material cristalino altamente activo, que producía los síntomas patológicos mencionados anteriormente cuando se aplicaba a las semillas de arroz. A esta sustancia se le denominó giberelina A y poco después ácido giberélico (GA_3), y presenta la siguiente estructura (II):



II

Del mismo hongo se han aislado otras giberelinas, y otras más de una gran variedad de plantas superiores y algunas (como el mismo ácido giberélico) de ambas fuentes³.

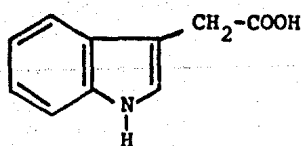
Las giberelinas promueven la elongación de los tallos, pero tienen poca o ninguna influencia en el crecimiento de la raíz.

Cuando se aplica ácido giberélico a varias especies de plantas en crecimiento, se induce una extensión anormal del tallo y las hojas, pero al aplicarlo a plantas genéticamente enanas, toman la apariencia de una planta de altura normal, es decir, crecieron por mutación.

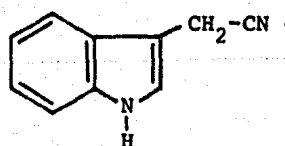
Existen otros compuestos que aunque no tienen la misma estructura básica de las giberelinas poseen la misma actividad biológica de tales fitohormonas, por ejemplo, un compuesto llamado helmintosporol aislado del hongo *Helminotsporium sativum*, y el ácido faseólico obtenido de semillas de frijol.

II.A.2. AUXINAS

En los vegetales se encuentran muchos derivados del indol, desde los alcaloides indólicos, relativamente complejos, hasta el propio indol que se encuentra en los capullos de naranja⁴. Los derivados del indol más importantes que contienen las plantas son las indolauxinas y, en particular: el ácido 3-indolacético (AIA) (III) y el indol-3-acetonitrilo (IAN) (IV) descubiertos en el año de 1934.



III



IV

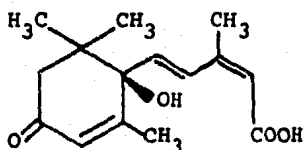
El nombre auxina proviene del griego auxein que significa crecido¹. Su importancia en fisiología vegetal radica en que son responsables del crecimiento y diferenciación de la planta.

Varios compuestos indólicos sintéticos tienen efectos parecidos al AIA, aunque no necesariamente contengan el esqueleto del indol. Ejemplos de esto son, la molécula del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y la del ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) que se usan como herbicidas⁵.

Ya que las auxinas se encuentran presentes en todas las plantas superiores en cantidades extremadamente pequeñas, fue muy difícil su aislamiento por primera vez.

II.A.3. ACIDO ABSCISICO

La dormina, abscisión II o mejor conocido como ácido abscísico (ABA) es una fitohormona⁷ con estructura química de un isoprenoide y posiblemente sea un derivado del caroteno violaxantina, con algún parecido estructural a la vitamina A, al cuál se le asignó una estructura química con base en sus espectros de absorción en el infrarrojo y otras propiedades físicas. Posteriormente se llevó a cabo su síntesis, con lo que quedó plenamente confirmada su estructura⁸ (V).



V

El ABA fue aislado en forma cristalina de algunas plantas superiores, sin embargo, las cantidades en que se encuentra presente son muy pequeñas, y se requieren de grandes cantida-

des de tejido para la extracción de cantidades cristalizables.

El isómero dextrógiro del ABA es el que se encuentra de manera natural en la planta. El producto sintético es una mezcla racémica de los dos enantiómeros: dextrógiro y levógiro. La mezcla racémica presenta poca actividad en un bioensayo³.

Además de presentar isomería óptica, el ABA también muestra isomería geométrica.

El ABA se ve involucrado en los procesos de inhibición del crecimiento y desarrollo de la planta⁴. En particular se encuentra asociado con la dormancia del capullo, inhibición de la floración, inhibición de la germinación de la semilla, geotropismo de la raíz, senescencia y formación de la capa de abscisión (de ahí su nombre).

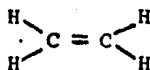
El efecto del ABA sobre la germinación en algunos casos es invertido por el ácido giberélico y en otros también por las citocininas.

En la actualidad se conocen otros compuestos que al igual que el ABA, actúan como inhibidores del crecimiento en las plantas, entre estos tenemos a los ácidos lumelárico, cafeico y ferúlico.

Cabe mencionar que las fitohormonas promotoras del crecimiento en concentraciones elevadas fisiológicamente, también pueden actuar como inhibidores del crecimiento⁵.

II.A.4. ETILENO

Aún cuando el etileno (VI) posee una estructura química simple, esto no impide que pueda ser considerado como hormona, en contraste con las moléculas químicas más complejas de las giberelinas, auxinas, abscininas y citocininas¹.



VI

Desde hace muchos años se conocen los efectos que tiene el etileno sobre las plantas³. Se tuvo conocimiento de su presencia en los vegetales por primera vez en un laboratorio, cuando trazas de un gas afectaba el comportamiento geotrópico del tallo y la raíz en la planta.

Su existencia como gas a temperaturas normales es, teóricamente, una ventaja para la planta, ya que al ser considerado como fitohormona, es una hormona gaseosa. El etileno es en realidad un regulador del crecimiento que se difunde fácilmente, a diferencia de otras hormonas que necesariamente se mueven a

través de la vida celular para alcanzar su sitio de acción. Aún en el presente no está bien claro como el etileno se ve in cluído en los procesos fisiológicos normales, ni como es la re lación entre sus efectos y las otras hormonas de crecimiento conocidas.

El etileno acelera el desarrollo de la fruta coincidiendo con el tiempo de respiración climateria (gran incremento de la respiración que ocurre durante el período de maduración de muchas frutas). La exposición de la fruta al etileno, da por resultado una apresurada y acrecentada respiración climateria con una pronta maduración.

Está rápida maduración de la fruta por el etileno ha sido de gran importancia y ayuda para la industria de los cítricos y de otros frutos.

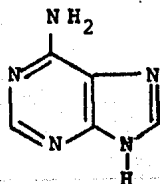
II.A.5. CITOCININAS

En las dos primeras décadas de éste siglo, se descubrió este grupo de fitohormonas en cultivos "in vitro" de embriones tiernos de tejidos y plantas, y fue hasta la realización de unos estudios sobre los requerimientos de los cultivos para el crecimiento de callos (masa indiferenciada y de rápida división celular) que se obtuvieron evidencias confiables de la existencia de las citocininas, hormonas de crecimiento en plan

tas, consideradas importantes en el proceso de la división y diferenciación celular, aunque más recientemente se ha reconocido que están implicadas en otros procesos fisiológicos, tal como la senescencia y la dominancia apical¹.

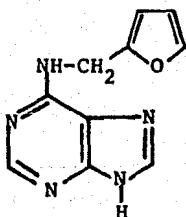
Estas sustancias se caracterizan por su habilidad para interactuar con el ácido 3-indolacético (AIA), una auxina, y promover la división celular en cultivos de crecimiento de células de plantas, ya que para que ocurra el crecimiento no solo es necesario añadir nutrientes al medio de cultivo, sino además estas sustancias de crecimiento. Sin embargo, cuando solo se aplica AIA y nutrientes al medio de cultivo, hay un pequeño crecimiento en la planta, que consiste predominantemente en el alargamiento de las células, es decir muy poca división celular y no hay diferenciación celular. No obstante, al añadir adenina al medio de cultivo, las células son inducidas a alargarse y dividirse. Por el contrario al añadir adenina sin auxina (AIA) no hay división celular en el tejido.

Las citocininas son sustancias que se derivan estructuralmente de la adenina (VII), mejor conocida como una de las bases nitrogenadas integrante de las moléculas de los ácidos nucleicos DNA y RNA³.



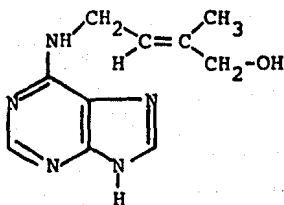
VII

Más tarde se obtuvieron otras sustancias a partir de la degradación del ácido desoxiribonucleico (DNA), con la misma estructura base de adenina pero con un efecto más potente. A una de estas sustancias se le llamó 6-(furfurilamino)purina, mejor conocida como kinetina (VIII), que al igual que la adenina, al interactuar con el AIA tiene efectos sobre la división y diferenciación celular en cultivos de tabaco. Este regulador del crecimiento no se encuentra de manera natural en las plantas¹⁰.



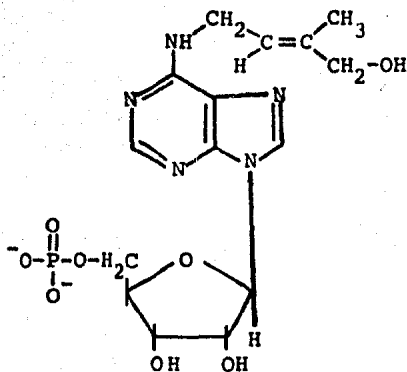
VIII

En 1964 se aisló a partir de granos de maíz dulce una citocinina identificada como 6-(4-hidroxil-3-metil-2-enil)aminopurina y a la que más tarde se le denominó zeatina (IX).



IX

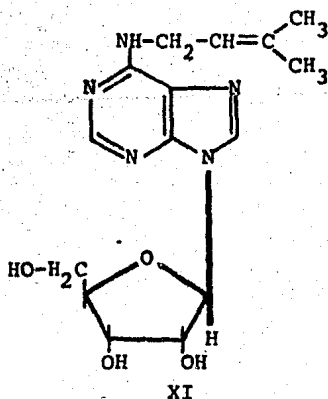
De manera subsecuente se identificaron otras citocininas. A la fecha se conocen ocho, que se han encontrado en extractos de granos de maíz, pero la zeatina es la más potente de éstas. Algunas, o quizás todas las citocininas naturales existen en la planta unidas a una pentosa y algunas veces a un fosfato, es decir, se encuentran como nucleósidos o nucleótidos respectivamente. Por ejemplo un nucleótido de la zeatina encontrado en granos de maíz es el 9- β -ribofuranosilzeatina-5'-fosfato (X).



X

Las citocininas naturales son muy similares en estructura a la zeatina, y sus derivados se han identificado en varias plantas, tal como la citocinina N⁶-(Δ^2 -isopentenil)adenosina, un nucleósido que se ha obtenido de granos de maíz, de espina-

ca, de chícharo, de levadura y de tejidos que sirven para alimentar al embrión durante su crecimiento, como el agua de coco. A esta sustancia se le conoce como isopenteniladenosina (IPA) (XI).



Ahora se sabe que la IPA se encuentra en el t-RNA de plantas y células animales. Por consiguiente, estos compuestos adenosín isoprenoides existen tanto como nucleósidos y nucleótidos así como en su forma libre.

El mencionar a estos cinco grupos de fitohormonas, no implica que no existan algunas otras³, tales como la tiamina (vitamina B₁) y la piridoxina (vitamina B₆) ambas producidas por las hojas y esenciales para el crecimiento de la raíz; el ácido nicotínico en plantas leguminosas; la riboflavina (vitamina

B₂) y el ácido pantoténico en el desarrollo de los embriones vegetales; y algunas otras que, tal vez, todavía quedan por descubrir⁵.

MÉTODOS DE ANÁLISIS QUÍMICO

Existen diversos métodos de análisis químico reportados en la bibliografía, para la identificación y cuantificación de las fitohormonas. Sin embargo, las pequeñas cantidades en que se encuentran las fitohormonas en las plantas, hace que algunos de éstos métodos de análisis sean poco selectivos y poco precisos.

Aunque el método del ensayo biológico o del ensayo inmuno químico sean muy conocidos para este tipo de compuestos, se usan poco, tal vez por lo especial del equipo y de los reactivos necesarios. No así otros métodos, que además de ser sensibles y precisos, se llevan a cabo a una velocidad conveniente, tal como la cromatografía líquida de alta presión y la cromatografía de gases que, acoplados a algún método de detección apropiada, optimizan la información cualitativa y cuantitativa, por lo que han sido considerados como los métodos modernos de análisis que pueden ser aplicados a todos los grupos de fitohormonas.

II.B.1. ENSAYOS BIOLÓGICOS

El ensayo biológico, también denominado bioensayo, es el método conocido más antiguo para la identificación de fitohormonas^A. Para llevar a cabo un bioensayo es necesario aislar órganos de tejidos de plantas, o quizás toda la plántula, bajo un estricto control de las condiciones del medio ambiente para preservar la máxima sensibilidad y menor variabilidad del tejido. Una vez aislados, estos tejidos se exponen a las fitohormonas o fracciones purificadas de extractos de plantas, y la respuesta obtenida se cuantifica. La respuesta puede ser elongación del tallo, biosíntesis de los pigmentos, incremento en la biomasa u otra respuesta específica.

Los bioensayos tienen varios problemas inherentes. La precisión se ve influenciada por la variabilidad de los tejidos de plantas que son las bases del ensayo. El tiempo de análisis es prohibitivo, ya que los más rápidos requieren de varias horas y algunas veces de días a semanas^{11,12}. Las sustancias potencialmente activas deben aplicarse exógenamente a los tejidos ensayados, dando por resultado baja sensibilidad debido a los problemas de su transporte hasta el sitio de acción y por el metabolismo. Estos problemas, acoplados con los requerimientos para un gran número de réplicas acaban con la precisión del análisis. Por otra parte debido a las bajas concentracio-

nes de fitohormonas en tejidos de plantas es muchas veces impráctico o imposible adquirir suficiente cantidad de hormona para los bioensayos. Algunos bioensayos tienen selectividad limitada o indefinida, lo cuál da lugar a un estricto requerimiento sobre el proceso de fraccionamiento que provee muestras homogéneas para su análisis; cualquier impureza en un extracto biológico, incluyendo inhibidores (un problema común) u otra molécula activa, compromete la interpretación del bioensayo. Estos problemas pueden ser el estímulo para el desarrollo de modernos análisis inmunológicos, cromatográficos y espectrométricos.

II.B.2. METODOS INMUNOQUIMICOS

Los ensayos inmunológicos se han usado ampliamente en el análisis de hormonas animales. Debido a su alta selectividad, mínima purificación requerida de la muestra y sensibilidad igual o mayor que la de los métodos fisicoquímicos¹⁷, los que tienen un gran valor analítico como instrumento para las investigaciones en medicina clínica y endocrinológica y se han aplicado también a la determinación de reguladores de crecimiento en plantas¹⁵, tal como los radioinmunoensayos (RIE) y la enzima inmunoensayo (EIE), con los que se pueden detectar hasta cantidades picomolares, y más recientemente el sistema acopla-

do HPLC-RIE, donde los extractos vegetales son fraccionados sobre una columna de fase inversa y posteriormente cuantificados por RIE¹⁶.

El procedimiento para este método requiere de la formación de un anticuerpo para el compuesto de interés. Como en las hormonas animales, las moléculas de las fitohormonas también son pequeñas por lo que es necesario formar una unión covalente entre la fitohormona y una molécula de gran tamaño, usualmente una proteína². La molécula así formada, fitohormona-proteína, llamada antígeno, se inyecta por vía intravenosa a un animal, en cantidad tal, que sea capaz de estimular la formación del anticuerpo. Las proteínas más usadas para conjugarse con las fitohormonas son: albúmina serica bovina (ASB), albúmina serica humana (ASH) y liposacáridos (LPS). En todos los casos han sido conejos los productores de los anticuerpos.

Las moléculas del anticuerpo aparecen en el suero sanguíneo (antisuero) y en los tejidos del conejo en respuesta a la inyección del antígeno, dando por resultado la formación del complejo antígeno-anticuerpo.

La formación de este complejo puede ser estudiada por medio de la reacción de la precipitina, formación de un precipitado al interactuar el antisuero con el antígeno. Para asegurar que se ha formado este complejo, el suero se difunde en gel, teniendo como respuesta positiva la aparición de una lí-

nea opaca en el lugar en que se deposita este complejo. La determinación cuantitativa se hace, usando un elemento radioactivo como integrante del antígeno y midiendo posteriormente la radioactividad presente en el complejo.

Los límites de detección reportados para los ensayos inmunológicos más sensibles son 0.1 ng para ABA; 0.2 ng para AIA; 5 ng para IPA y 0.02 ng para t-zeatinaribosido^{14,17}.

Por este método pueden analizarse varios cientos de muestras en un solo día, e incluso analizarse extractos en crudo. Su principal desventaja es el largo proceso para la obtención de los anticuerpos específicos¹³.

II.B.3. CROMATOGRAFIA

La cromatografía es un procedimiento de gran utilidad para la separación de los componentes de una mezcla, mediante el reparto simple entre dos fases. Este proceso se lleva a cabo introduciendo cantidades de muestra del orden de μg en una columna empacada con un material denominado fase estacionaria, a lo largo de la cual se hace circular un flujo de la fase móvil, (gas o líquido) separándose los componentes y saliendo de la columna en diferentes tiempos.

Las separaciones se clasifican según la naturaleza de las fases que intervienen, por ejemplo, líquido-sólido, líquido-lí

quido, gas-líquido, gas-sólido¹⁹.

II.B.4. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION

En años recientes, la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se ha usado como la técnica de separación más poderosa que se encuentra disponible para el aislamiento y cuantificación de fitohormonas²⁰.

Las ventajas que presenta son: gran capacidad de muestreo, lo que permite recuperar material biológico a partir de extractos de plantas; gran poder de resolución; separaciones más rápidas de los componentes que con columnas convencionales; y velocidad en las separaciones, que pueden realizarse en menos de una hora.

El proceso consiste en hacer pasar la fase móvil a través de la columna a velocidades lineales de flujo que pueden ser hasta 100 veces más rápidas que en la columna de cromatografía tradicional. La columna que se usa está empacada eficientemente con partículas muy pequeñas de diversos materiales, según la técnica empleada, para que se establezca un rápido equilibrio entre las fases estacionaria y móvil; dicha columna suele ser de acero inoxidable, soporta grandes presiones (3000 lb/in² o más), su diámetro interno es de 1 a 3 mm y su longitud depende del grado de dificultad de la separación, puede ser de 0.5

a 1.0 m. La muestra se inyecta al sistema cerca de la parte superior de la columna, mediante una jeringa cuya capacidad es del orden de μl . El volumen y la cantidad de muestra por analizarse deben ser pequeños, para obtener picos bien delineados y angostos, y permitir así que la separación sea más rápida¹¹.

Al salir de la columna el eluyente (fase móvil) que puede o no contener un componente de la mezcla penetra al detector. Casi siempre se usa un detector de ultravioleta con longitud de onda fija a 254 nm (o en ciertos casos a 280 nm). Todos los compuestos orgánicos aromáticos absorben intensamente a esta longitud de onda y también otros compuestos orgánicos y muchos complejos inorgánicos, lo que lo hace parcialmente selectivo como un método analítico de fitohormonas¹⁷. Los límites de detección por inyección a 254 nm para ABA es de 0.5 a 5.0 ng; para derivados de giberelinas es de 5.0 ng; para citocininas es de 4.0 ng; y para AIA a 280 nm es de 5.0 a 20.0 ng. La respuesta del detector está en función de la concentración de la muestra, dando un pico como señal eléctrica.

En algunas otras ocasiones se han usado otros tipos de detectores, tales como el detector de índice de refracción (IR), especialmente para indoles, donde se ha detectado cantidades de AIA de 10 a 20 pg y derivados de giberelinas de 5 pg; el detector de fluorescencia para determinar AIA y el detector radioactivo, que permite la detección de compuestos marcados

radioactivamente.

Las diferentes técnicas de HPLC usadas para el análisis de muestras son: partición en fase normal, partición en fase inversa, adsorción e intercambio iónico.

Partición en fase normal HPLC

El sistema de partición en fase normal es técnicamente complejo, debido en parte a la inestabilidad de la fase estacionaria, lo que hace que su uso sea restringido. Se lleva a cabo una excelente separación y resolución del sistema, debido al reciente uso de las fases polares enlazadas¹⁴. Estos materiales que tienen como base sílica gel con superficie recubierta (enlaces covalentes Si-O), tienen una gran variedad de sustituyentes polares. Para la separación de zeatinas sintéticas como zeatina-7-glucósido y zeatina-9-glucósido se usa una columna de partisol PAC (fase enlazada con cianuro).

Partición en fase inversa HPLC

El límite de uso de la fase normal, ha hecho que la técnica de fase inversa, sea actualmente de gran uso ya que ha demostrado ser el método más adaptable y preciso para la separación de fitohormonas. Los materiales que usa se basan en partículas de sílica gel teniendo como fase enlazada una superficie recubierta de grupos hidrocarbonados, tales como C₂, C₆, C₈,

C₁₈ y fenilos como fase estacionaria y como fase móvil una solución acuosa. La columna de octadecilsilano (ODS o C₁₈) es el material más usado para el análisis de fitohormonas, debido en parte a su gran resistencia al uso.

Adsorción HPLC

Poco se ha usado esta técnica en HPLC, debido a su baja actividad en comparación con su uso en cromatografía en capa fina (CCF), pero es de gran utilidad para la separación de isómeros geométricos cis y trans del ABA. Algunas separaciones se han llevado a cabo con empaque de sílica que ha sido modificada por silación (con cloruro de trimetilsilano) o por argentación (con nitrato de plata)¹⁷.

Intercambio iónico HPLC

Esta técnica se ha usado para análisis de varios tipos de compuestos, pero no exactamente para fitohormonas ya que los materiales que se usan en su proceso no son adecuados para ello, como el uso de buffers no volátiles que son difíciles de remover.

La existencia de estas diferentes técnicas de separación de HPLC, todas con mecanismos diferentes es una gran ventaja, ya que para una mejor resolución de un análisis, puedan usarse conjuntamente como un método analítico cuantitativo.

HPLC es el método de elección cuando se trata de separar productos poco estables, de alto peso molecular y cuando convenga que en la detección no se alteren los componentes de la muestra¹⁹.

II.B.5. CROMATOGRAFIA DE GASES

La cromatografía de gases (CG) es una técnica rápida en la separación de mezclas. La posibilidad de convertir muchos materiales en un derivado volátil, amplía la aplicabilidad de este método.

La CG incluye los sistemas gas-líquido, el cual se basa en una separación por partición de una muestra entre una fase gaseosa móvil y una capa delgada de un líquido no volátil sostenida sobre un soporte sólido; y gas-sólido que emplea un absorbente sólido como fase estacionaria²⁷.

La secuencia de una separación cromatográfica de gases consiste en introducir la muestra por inyección a un bloque de calentamiento, donde se vaporiza instantáneamente y se arrastra en forma de vapor por medio de un gas portador, que puede ser helio, nitrógeno o argón, hacia la entrada de la columna. Los solutos se adsorben en la cabeza de la columna en la fase estacionaria y después son eluidos al hacer pasar gas portador puro. Este proceso se verifica varias veces a medida que la

muestra se desplace hacia la salida con el gas portador. Cada soluto se moverá a su propia velocidad a través de la columna y, por consiguiente, se formará una banda por cada soluto. Los solutos se eluyen sucesivamente en orden creciente de sus proporciones de partición y entran a un detector conectado a la salida de la columna. El tiempo de emergencia de un pico identifica el componente, y el área de dicho pico indica la proporción del componente en la mezcla. Aunque el método de CG está limitado a materiales volátiles (un 15% de todos los compuestos orgánicos), la disponibilidad de trabajar a temperaturas elevadas de hasta 450°, hace a esta técnica muy útil.

Existen dos tipos básicos de columnas cromatográficas de uso común: empacadas y capilares. Las columnas empacadas son tubos rellenos de un soporte inerte recubierto con una fase líquida no volátil para utilizarse en la cromatografía gas-líquido, o rellenas de un adsorbente o de una malla molecular, para la cromatografía gas-sólido, su longitud suele ser de 0.7 a 2 m. Las columnas capilares presentan una excelente resolución de mezclas, su pared interior está recubierta de una fina película de fase estacionaria, su longitud varía entre 30 y 300 m. Estas columnas se suelen construir de acero inoxidable, de nylon o de vidrio. Se afirma que las columnas capilares dan mayor resolución en menos tiempo y a menor temperatura que las columnas empacadas.

El empaque de una columna para CG generalmente es algún soporte sólido granular recubierto con un líquido no volátil. El soporte sólido debe ser inerte, poroso y con gran superficie de contacto. Los más usados son de diatomeas, un material que en su mayor parte es sílice; polvo de ladrillo refractario, tratado especialmente; tierra de infusorios; cuentas de vidrio; teflón y otros materiales más específicos (poropak o chromosorb).

La fase líquida estacionaria que se use deberá ser fuertemente retenida por el soporte sólido, térmicamente estable y no volátil a la temperatura de trabajo, y además químicamente inerte hacia los solutos que se van a separar. Existen varios líquidos de partición, que van desde los no polares SE-30, OV-1 y OV-101 (metil-silicón), de polaridad intermedia OV-17 (fenil-silicón) hasta los polares como carbowax 4000 (poliglicol). La regla general de "disolución de sustancias semejantes" es útil para seleccionar fases líquidas.

Mientras que la aptitud del cromatógrafo para efectuar separaciones está determinada por la composición del relleno de la columna, los factores que determinan la utilidad analítica de la técnica son la inyección de la muestra y la detección de los componentes eluidos.

La función de los detectores es la de seguir de un modo continuo la composición del gas efluente de la columna, midien

do sus variaciones. Se han propuesto muchos tipos de detectores, entre los más comunes se encuentran: la celda de conductividad térmica (termoconductividad), de ionización de flama y de captura de electrones.

Celda de conductividad térmica (DCT). La señal del detector es la diferencia de conductividad térmica entre el gas de arrastre puro y el gas de arrastre que contiene la muestra. Es to se indica mediante la resistencia eléctrica de filamentos calientes por los cuales atraviesa el flujo de gas. Se usa tan to para compuestos orgánicos como inorgánicos, su límite de detección es de 5 $\mu\text{g/ml}$ de concentración de la muestra gaseosa o de 10 ng en peso de muestra.

Detector de ionización de flama (DIF). Este tipo de detec tor es en la actualidad el más popular debido a su alta sensibilidad, amplio intervalo y gran confiabilidad. La señal del detector es proporcional al número de iones que se producen al quemar la muestra mezclada con el gas de arrastre y el hidrógeno. Se usa para compuestos orgánicos, no responde ante muchos gases inorgánicos como CO_2 , H_2O , CO , SO_2 , H_2S y NH_3 . Es de uti lidad para analizar extractos acuosos, detecta cantidades pequeñas de 1 ng de compuesto.

Detector de captura de electrones (DCE). Su principio se basa en la absorción de electrones por parte de compuestos que tienen una afinidad para los electrones libres. Estos compues-

tos tienen un elemento o un grupo electronegativo (compuestos halogenados y ciertos hidrocarburos aromáticos). Este detector es altamente selectivo, sensitivo y con un gran rango dinámico. Su límite de detección es de 5 a 10 pg para columnas empacadas y de 0.3 pg para columnas capilares.

El espectrómetro de masas (EM) es el detector más selectivo que puede ser acoplado a CG. El acoplamiento del sistema CG a EM, combina el poder de separación del primero con la calidad de detección selectiva del segundo, teniendo una importante característica en común: la cantidad de material que puede manejarse es del mismo orden. Los compuestos son ionizados dentro del EM y los iones fragmentados son separados y analizados sobre la base de su relación masa/carga (m/c). El espectro de masas obtenido puede compararse con el espectro de referencia del compuesto conocido para la identificación de la muestra.

Para todas las fitohormonas, excepto el etileno, debe de hacerse previamente su derivado volátil para ser analizadas por CG-EM. Para las citocininas son derivados silylados²⁸⁻³¹.

Después de conocer de manera somera las dos técnicas cromatográficas más usadas para el análisis de las fitohormonas, en la práctica podría surgir la duda de si convendría más usar CG o HPLC en un caso determinado. Ambas son técnicas excelentes y se complementan en parte. Puede usarse HPLC para muestras que no sean volátiles o que se descompongan a las tempera

turas usadas en CG. En HPLC no se cuenta con un detector sensible para sustancias que no absorban en el ultravioleta. Los diversos detectores que se usan en CG detectan prácticamente cualquiera de los compuestos orgánicos, y en muchos casos cantidades mínimas. La CG suele ser más rápida, aunque HPLC está avanzando grandemente en este aspecto.

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

A continuación se presentan algunos de los métodos de extracción de citocininas que se encuentran en la literatura, y que fueron analizados con el propósito de seleccionar el más viable para nuestro trabajo.

Thomas, T.H. et al²² informan la extracción de citocininas a partir de col.

La muestra se extrae dos veces con etanol absoluto a 3°C, se filtra y el filtrado se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en agua y se extrae cinco veces con hexano, eliminando la fracción orgánica y a la acuosa se le añade un exceso de etanol y se deja reposar toda la noche a 3°C para que precipiten las proteínas y los lípidos. Nuevamente se filtra, el filtrado se evapora a sequedad y se le añade agua. Se deja agitando la solución con polivinil pirrolidona (PVP) toda la noche, al cabo de la cual la solución se filtra y se ajusta el pH a 6.4, extrayéndose con butanol saturado de agua. Los extractos de butanol se evaporan a sequedad, se disuelve en poco etanol y se pasa a través de una columna de PVP/CaSO₄ eluyéndose con me

tanol al 70%. Lo eluido se analiza por HPLC.

Horgan, R.²³ informa la extracción de citocininas a partir de material de planta.

El tejido de la planta se congela en nitrógeno líquido y se le agrega gota a gota una mezcla de metanol-cloroformo-ácido fórmico (12:5:3 v/v) enfriando a -20°C. La solución se deja reposar por espacio de 24 hr. a -20°C, después de este tiempo se homogeniza y centrifuga a 2000 x g. Posteriormente se extrae con metanol-ácido fórmico-agua (60:40:1 v/v) por 1 hr. a -20°C, se centrifuga y los sobrenadantes se combinan para evaporarlos a presión reducida. El residuo se analiza por métodos cromatográficos.

Andersen, R.A. and Kemp, T.R.²⁴ informan la extracción de citocininas a partir de extractos de plantas.

La muestra se homogeniza en etanol, se centrifuga y el residuo se desecha. A la solución sobrenadante se le ajusta el pH a 9 con NaOH 0.1 M, se extrae cuatro veces con butanol saturado de agua, y estos extractos se liofilizan. El material sólido obtenido se disuelve en metanol-agua, haciendo pasar esta solución a través de una columna sephadex LH-20. Las fracciones colectadas se analizan por HPLC.

Tegelman, A.J.³² informa la extracción de citocininas a partir de maíz.

Las semillas se homogenizan con metanol al 80% por 24 hr. a 4°C. La solución se filtra a través de una capa de celita y esta se lava con metanol. El filtrado se concentra al vacío a 40°C y se ajusta a pH=3.5, se le añade PVP y se deja agitando toda la noche a 4°C. La solución se filtra, se ajusta el pH a 8.5 y se extrae con butanol. Todas las fracciones butanólicas se evaporan a sequedad a 40°C, al residuo se le agrega etanol al 50% y se aplica sobre una columna de duolita CS-101 (pH=5), se lava con agua de pH=10 y se eluye con NH₄OH 1 N en etanol al 70%. Las fracciones obtenidas se evaporan a sequedad y se analizan por bioensayo.

Taylor, J.S. and Simpson, G.M.³³ informan la extracción de citocininas a partir de semillas de avena.

Las semillas se homogenizan y se extraen con metanol al 80% por 36 hr. a 4°C. El residuo de la semilla se elimina y los extractos de metanol se ajustan a pH=8, centrifugándose por 4 hr. Al sobrenadante se le ajusta el pH=3 y se pasa a través de una columna de fosfato de celulosa. Las fracciones obtenidas se les ajusta el pH=7 y se extraen con butanol saturado de agua, analizándose por métodos cromatográficos.

Vizárová, G. and Vozár, I.³⁴ informan la extracción de citocininas a partir de granos de cebada y trigo.

Las semillas se muelen y se extraen con etanol al 76%, el extracto se filtra y el filtrado se evapora casi a sequedad al vacío. El residuo se diluye con agua destilada y se acidula a $\text{pH}=3$ con HCl 0.1 M, y se extrae tres veces con éter etílico por 4 hr. A la fase acuosa se le ajusta el valor de $\text{pH}=7.8$ con NH_4OH 0.1 M y se extrae con butanol tres veces por 8 hr. Todas las fracciones de butanol se evaporan a sequedad y el residuo se disuelve en HCl 0.1 M, purificándose con una columna Dowex 50 y se eluye con NH_4OH 0.1 M. Las fracciones recuperadas se evaporan a sequedad, el residuo obtenido se disuelve en etanol al 96% y se usa para análisis cromatográficos.

Nishinari, N. and Syono, K.³⁵ informan la extracción de citocininas a partir de callo de tabaco.

El tabaco se inocula en un medio de cultivo adecuado, las células se colectan por filtración y se homogenizan con etanol al 80% en un mortero frío, el homogenizado se centrifuga a $10,000 \times g$ a 4°C por 20 min. El precipitado se disuelve y se extrae con etanol al 80% por 1 hr. enfriando, después se centrifuga a $10,000 \times g$ a 4°C por 20 min. Todos los extractos de etanol se concentran al vacío a 40°C , después la muestra se disuelve en agua y se ajusta a $\text{pH}=3$ con HCl 1 N y se extrae tres

veces con n-hexano. La fase acuosa residual se ajusta a pH=8 con NaOH 1 N y se extrae tres veces con n-butanol saturado de agua. Todos los extractos de n-butanol se combinan y se concentran a sequedad al vacio a 40°C. El residuo se disuelve en metanol al 80% y se hace análisis por cromatografía en capa fina (CCF), separando cada fracción para determinar su actividad biológica por bioensayo de callo de tabaco, o por HPLC. La fase acuosa se hidroliza con fosfatasa alcalina (mucosa intestinal de becerro) a 37°C por 3 hr. Después de este tratamiento se extrae tres veces con n-butanol saturado de agua, todos los extractos de n-butanol se concentran al vacio a 40°C. El residuo se disuelve en metanol al 80% y se hace análisis por CCF o por HPLC.

Según Nishinari y Syono el método de extracción separa las citocininas libres, que se extraen con n-butanol, de las citocininas conjugadas, que quedan disueltas en el agua. Después de una hidrólisis con fosfatasa alcalina, las citocininas conjugadas quedan libres y pueden extraerse con n-butanol.

III. PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

Todos los reactivos son R.A. y se usaron sin una previa purificación, excepto la piridina que se destiló sobre hidróxido de potasio recogiendo la fracción que hierve a 94°C.

El estándar de zeatina (isómero trans) es de Sigma Chemical Company.

Las semillas de maíz (*Zea mays*) H-32 y chalqueño fueron donadas por la Dra. Estela Sánchez del departamento de Bioquímica Vegetal.

El 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS), trimetilclorosilano (TMCS) y bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), reactivos específicos para hacer derivados sililados para cromatografía de gases, son de Aldrich Company.

Las centrifugaciones se hicieron en una centrifuga clínica.

Para el análisis de las muestras se usó:

a) Un cromatógrafo de líquidos marca Waters Assoc. con una bomba de alta presión 6000 A, un inyector universal U6K, un módulo de compresión radial RCM-100, columna radial pak de octadecilsilano con tamaño de partícula de 5 μ m y un espectro-

fotómetro UV-VIS marca Perkin-Elmer modelo LC-55.

Condiciones experimentales: fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v, flujo 1.5 ml/min., atenuación 3, velocidad de la carta 5 in/min., longitud de onda 254 nm, volumen por inyección 25 µl.

b) Un cromatógrafo de gases marca Perkin-Elmer, modelo 3920, con detector de ionización de flama.

Condiciones experimentales: columna 3% OV-17, gas acarreador: nitrógeno a 30 ml/min., programado de 200 a 270°C, 8°/min., atenuación 3, velocidad de la carta 5 in/min., volumen por inyección 1 µl.

c) Un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas CG5988A.

Condiciones experimentales: columna capilar de metilfenil-silicón (25 m X 0.25 mm D.I.), programado de 200 a 260°C, 5°/min.

Extracción de citocininas.

La extracción de citocininas a partir de maíz se hizo con granos de elote y semillas de los genotipos H-32 y chalqueño. Además, de ambos genotipos de semillas se separó manualmente el embrión completo y también el eje embrionario y el escutelo. A cada una de estas partes se les hizo la misma determinación.

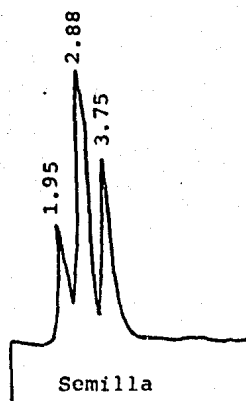
Antes de iniciar la extracción, las muestras se muelen perfectamente, la semilla completa con un molino manual; los

granos de elote, el embrión completo y el escutelo con una licuadora; y el eje embrionario con un mortero. La metodología seguida es la siguiente:

10 g de muestra se homogenizan con 30 ml de etanol al 80%, enfriando exteriormente con un baño de hielo-sal. El homogenizado se centrifuga a la máxima velocidad por espacio de 20 min. a temperatura ambiente. El residuo se suspende en 20 ml de etanol al 80% y se deja agitando en un baño de hielo-sal 20 min. El extracto se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones ya mencionadas. Todos los extractos de etanol se concentran casi a sequedad a 25 mm Hg y 40°C. El residuo se diluye con agua hasta un volumen de 15 a 20 ml y se acidula a pH=3 con HCl 1 N, extrayéndose tres veces con fracciones de 10 ml cada una de n-hexano. La fase acuosa residual se ajusta a pH=8 con NaOH 1 N y se extrae tres veces con fracciones de 10 ml cada una de butanol saturado de agua. Todos los extractos butanólicos se concentran a sequedad a 5 mm Hg y 40°C.

Análisis por HPLC.

El residuo final de la extracción, se disuelve en la cantidad suficiente de metanol grado espectroscópico, se filtra y el filtrado se analiza en el cromatógrafo de líquidos. La respuesta de separación de los componentes de la muestra se obtiene a través de un registrador en forma de un cromatograma característico de la muestra:



Análisis por CG-EM.

Para analizar la muestra por este método, lo primero es hacer un derivado volátil sililado, que se prepara disolviendo la muestra en piridina seca y añadiendo los reactivos sililantes HMDS-TMCS 2:1. Se toma una muestra del líquido obtenido que se inyecta al cromatógrafo de gases y de cada pico registrado en el cromatograma se obtiene su espectro de masas¹³.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS Y DISCUSION

Como puede verse a partir de lo presentado en el capítulo de antecedentes, los métodos de análisis descritos para las fitohormonas son muy variados, y de estos se eligieron aquellos que ofrecían resultados cuantitativos y mayor velocidad de análisis. Por otra parte los métodos de extracción de citocininas revisados, muestran cierta afinidad entre sí, la mayoría de ellos se lleva a cabo en muchos pasos, mucho tiempo y además algunos usan material no disponible por nosotros para llevarlos a cabo. Es por todo esto que el método considerado como el más adecuado para la extracción de citocininas a partir de maíz, en nuestro laboratorio, es el propuesto por Nishinari y Syono³⁵, que se adaptó de la siguiente manera:

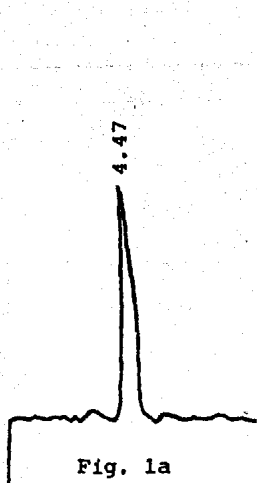
Las semillas se muelen en presencia de un medio alcohólico-acuoso (80:20 v/v), dejándose en extracción dos veces por 20 min. Las fracciones alcohólicas se recuperan por centrifugación, eliminando el residuo de la semilla, y se concentran al vacío. El residuo de la evaporación se re

suspende en agua, para acidular y extraer con un disolvente orgánico, como hexano, con objeto de eliminar los compuestos ácidos y los neutros solubles en el disolvente. Después de las extracciones con hexano, la solución acuosa se ajusta a pH básico, para la extracción de las citocininas con butanol, que posteriormente se evapora a sequedad. El residuo final puede o no purificarse por cromatografía de intercambio iónico, para su análisis de identificación y cuantificación por HPLC o CG-EM.

Para probar y optimizar el método de extracción y el de análisis por HPLC para las citocininas, se trabajó inicialmente con elote. En las figuras 1a a 1d se presentan los cromatogramas típicos de un estándar de zeatina y de una muestra de elote, usando diferentes proporciones de metanol y agua en la fase móvil.

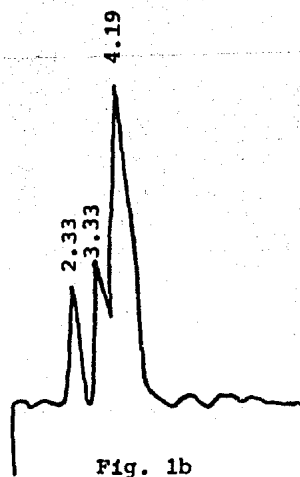
Estándar de t-zeatina de concentración 2.36×10^{-5} M.

Fase móvil MeOH-H₂O 30:70 v/v



Estándar t-zeatina

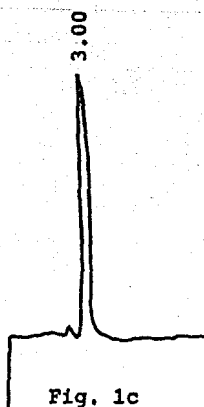
t_R (min)	Conc. (%)
4.47	81.0301



Elote

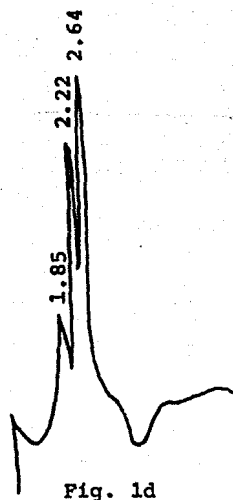
t_R (min)	Conc. (%)
2.33	25.5260
3.33	15.6868
4.19	57.9352

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v



Estándar t-zeatina

t_R (min)	Conc. (%)
3.00	98.1561



Elote

t_R (min)	Conc. (%)
1.85	6.4638
2.22	34.3532
2.64	57.1907

Comparando los dos cromatogramas correspondientes a la muestra de elote, puede observarse la aparición de tres picos, de los cuales el de tiempo de retención de 4.19 min. (Fig. 1b) y 2.64 min. (Fig. 1d) corresponden a la zeatina. Este experimento se repitió varias veces encontrándose en cada caso resul

tados iguales.

Una vez probadas las condiciones adecuadas para el análisis de las muestras, se aplicó a genotipos de maíz H-32 y chalqueño. Sin embargo en el transcurso del trabajo experimental se presentaron varios problemas que hicieron difícil que los resultados obtenidos pudieran reproducirse regularmente.

Por una parte solo se contaba con estándar de una sola citocinina, la zeatina (isómero trans), de la que además se tenía muy poca cantidad, lo que impedía usar estándar en cada uno de los experimentos de extracción y análisis, por lo que fue necesario usar los datos de tiempo de retención del estándar de los experimentos anteriores.

Aún en estas condiciones, se trabajó primero con el genotipo de maíz H-32, y como había interés en saber en que parte de la semilla se encontraban las citocininas, se separó manualmente el embrión de un lote de 10 g de semilla. Se hizo una extracción de dichos embriones paralela a la de otro lote similar de semilla completa. Ambas muestras se analizaron por HPLC obteniéndose cromatogramas muy semejantes, los resultados se muestran en las figuras 2a y 2b.

Muestra	Peso (g)	Extracto (g)
H-32		
semilla	9.8664	0.0119
embrión	lo obtenido de 10 g de semilla	0.0124

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

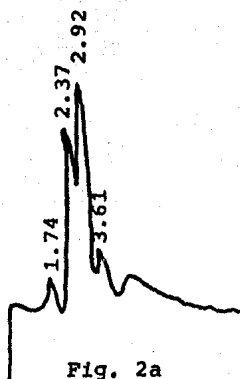


Fig. 2a

Semilla

t_R (min)	Conc. (%)
1.74	8.5913
2.37	31.4189
2.92	46.9603
3.61	13.0295

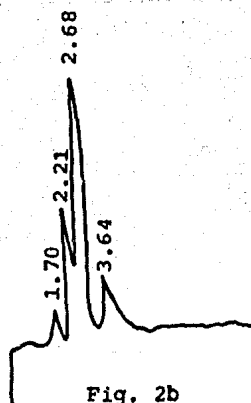


Fig. 2b

Embrión

t_R (min)	Conc. (%)
1.70	3.4551
2.21	23.2493
2.68	62.8320
3.64	10.4636

En el caso de semilla seca fue necesario cambiar las proporciones de la fase móvil metanol-agua, ya que si se usaba la misma mezcla que en el caso de elote, se tenían problemas con la bomba del cromatógrafo.

En el cromatograma el pico que presenta un tiempo de retención de 2.92 min. en la semilla (Fig. 2a) y de 2.68 min. en el embrión (Fig. 2b), se consideraron correspondientes a la zeatina, por correlación con el estándar (tiempo de retención de 3.00 min., Fig. 1c). De estos resultados se puede concluir que las citocininas se encuentran concentradas en el embrión de la semilla, ya que las cantidades obtenidas de 9.8664 g de semilla completa son muy semejantes a las obtenidas de los embriones separados de 10 g de semilla, como puede verse en los datos de las figuras 2a y 2b.

Sabiendo que las citocininas se encuentran en el embrión, pero que este está constituido por dos partes: eje embrionario y escutelo, faltaría saber si las citocininas se encuentran distribuidas en ambas partes o tan solo en una de ellas. Para contestar a esta pregunta se procedió a separar ambas partes del embrión, haciéndose la extracción por separado del eje embrionario y del escutelo, paralelamente a la extracción de semilla completa para poder comparar.

En este experimento se uso estándar de zeatina para enriquecer las muestras en el momento de inyectarlas al cromatógra

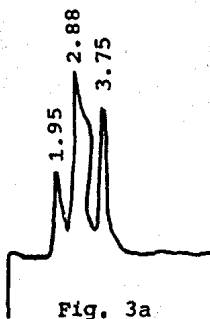
fo de líquidos. Los resultados obtenidos se presentan en la figuras 3a a 3g.

Estándar de t-zeatina de concentración 1.3041×10^{-3} M.

Muestra	Peso (g)	Extracto (g)
H-32		
semilla	10.0049	0.0125
eje embrionario	0.2554	0.0057
escutelo	2.4430	0.0165

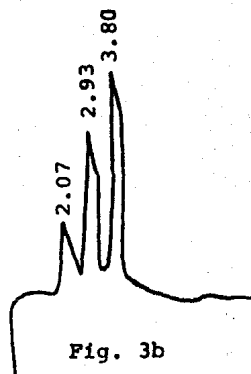
} lo obtenido de 10 g de semilla

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v



Semilla

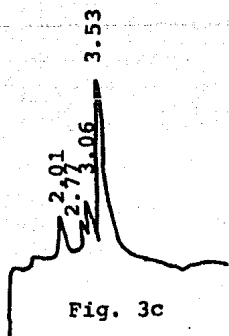
t_R (min)	Conc. (%)
1.95	8.7815
2.88	66.5418
3.75	21.2661



Semilla enriquecida

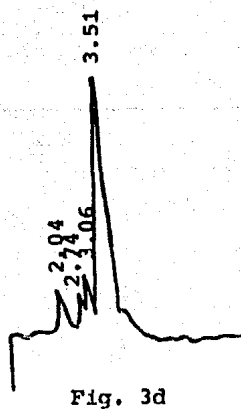
t_R (min)	Conc. (%)
2.07	13.0842
2.93	42.9386
3.80	42.1528

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v



Eje embrionario

t_R (min)	Conc. (%)
2.01	2.8227
2.77	4.0735
3.06	6.1000
3.53	87.0037



Eje embrionario enriquecido

t_R (min)	Conc. (%)
2.04	3.8530
2.74	2.5236
3.06	2.6982
3.51	90.2953

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

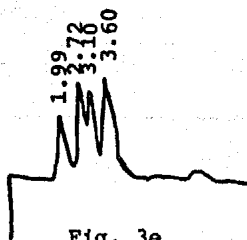


Fig. 3e

Escutelo

t_R (min)	Conc. (%)
1.99	22.1107
2.72	30.0891
3.10	26.9553
3.60	18.5509

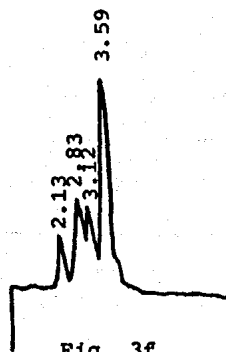


Fig. 3f

Escutelo enriquecido

t_R (min)	Conc. (%)
2.13	11.6229
2.83	19.0078
3.12	13.0481
3.59	55.9173

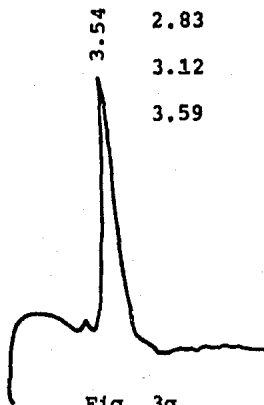


Fig. 3g

Estándar t-zeatina

t_R (min)	Conc. (%)
3.54	99.5027

Los cromatogramas obtenidos en este experimento, muestran el mismo tipo de patrón que el obtenido en la figura 2a y 2b, aunque los tiempos de retención son diferentes.

En este caso el estándar muestra un tiempo de retención de 3.54 min. (Fig. 3g) en contraste con el de 3.00 min. de la figura 1c. Sin embargo al enriquecer con el estándar las muestras de semilla (Fig. 3b), eje embrionario (Fig. 3d) y escutelo (Fig. 3f) crece el pico que desde un principio se creía era la zeatina (3.50 a 3.60 min.).

Por los resultados obtenidos se concluye que cerca de un 85% de las citocininas presentes en el embrión se encuentran concentradas en el eje embrionario y el restante 15% en el escutelo.

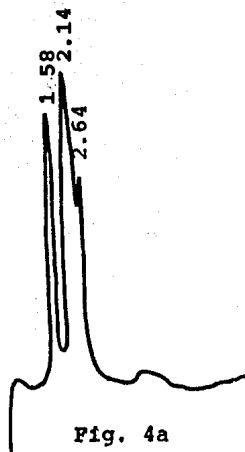
Aunque es de llamar la atención que los tiempos de retención del estándar y de los extractos sean diferentes a los presentados en la figura 2a y 2b, se considera como un fenómeno común en cromatografía.

Con el objeto de corroborar los resultados anteriores se repitió el experimento. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 4a a 4c.

Estándar de t-zeatina de concentración 2.4620×10^{-4} M.

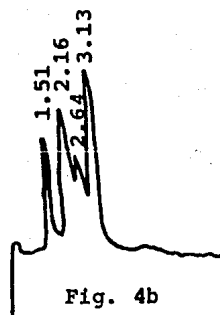
Muestra	Peso (g)	Extracto (g)
H-32		
semilla	9.9171	0.0320
eje embrionario	0.3398	} lo obtenido de 10 g de semilla
escutelo	2.4008	

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v



Semilla

t_R (min)	Conc. (%)
1.58	17.8455
2.14	49.2466
2.64	32.7454



Semilla enriquecida

t_R (min)	Conc. (%)
1.51	12.8189
2.16	32.9888
2.64	16.3075
3.13	37.4941

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

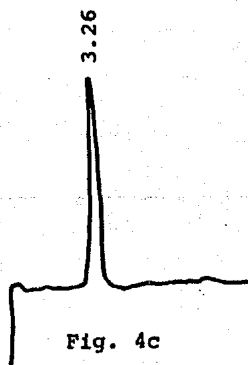


Fig. 4c

Estándar t-zeatina

t_R (min)	Conc. (%)
3.26	96.4656

En este caso se uso estándar y se enriquecieron las muestras en el momento de inyectarlas al cromatógrafo de líquidos, para su análisis. Sorpresivamente en este caso la muestra enriquecida presenta un pico adicional con tiempo de retención de 3.13 min. (Fig. 4b) que no aparece en la muestra sin enriquecer (Fig. 4a).

Ante este resultado inesperado se decidió hacer la extracción en genotipo de maíz chalqueño, para esclarecer si la ausencia de zeatina en H-32 se debía a que la cantidad en que se encontraba en la semilla era muy pequeña y no se podía detec-

tar o tal vez a errores en el método de extracción.

Se procedió entonces a hacer extracciones en semilla completa, eje embrionario y escutelo de maíz chalqueño. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 5a y 5b.

Estándar de t-zeatina de concentración 2.4620×10^{-4} M.

Muestra	Peso (g)		Extracto (g)
Chalqueño			
semilla	10.0397		0.0175
eje embrionario	0.0808	} lo obtenido de 10 g de semilla	0.0081
escutelo	0.6327		0.0183

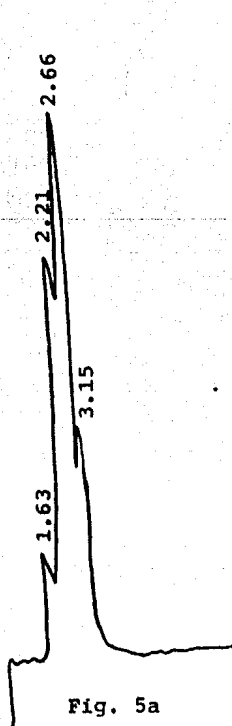
Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

Fig. 5a

Semilla

t_R (min)	Conc. (%)
1.63	2.5955
2.21	25.0231
2.66	64.5175
3.15	7.8639

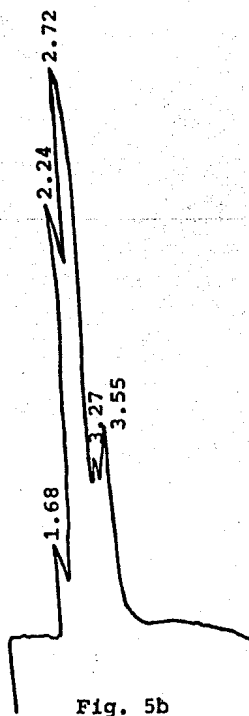


Fig. 5b

Semilla enriquecida

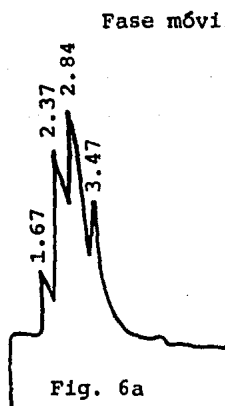
t_R (min)	Conc. (%)
1.68	2.5090
2.24	23.6055
2.72	58.3874
3.27	6.6255
3.55	8.7844

Las muestras se enriquecieron en el momento de inyectarlas al cromatógrafo de líquidos, apareciendo un pico con tiempo de retención de 3.55 min. (Fig. 5b) que no aparece en la muestra sin enriquecer (Fig. 5a). Concluyéndose que en este ge notipo de maíz no se detecta zeatina con la metodología seguida.

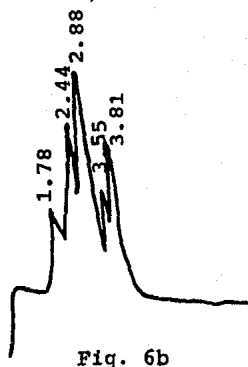
El experimento se repite, obteniéndose resultados similares que se presentan en las figuras 6a a 6c.

Estándar de t-zeatina de concentración 1.3100×10^{-3} M.

Muestra	Peso (g)	Extracto (g)
Chalqueño	10.1141	0.0167



Semilla



Semilla enriquecida

t_R (min)	Conc. (%)	t_R (min)	Conc. (%)
1.67	2.7170	1.78	3.0541
2.37	48.1404	2.44	40.6372
2.84	40.9810	2.88	35.9133
3.47	8.0659	3.55	6.4360
		3.81	13.8770

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

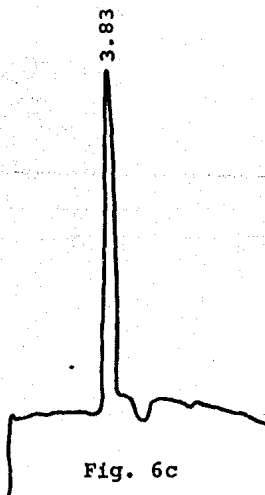


Fig. 6c

Estándar t-zeatina

t_R (min)	Conc. (%)
3.83	97.1364

En este caso el tiempo de retención del estándar de zeatina es de 3.83 min. (Fig. 6c).

Puede observarse que el patrón del cromatograma es el mismo que se muestra en la figura 5a y 5b, con la diferencia de que ahora el tiempo de retención de la muestra enriquecida, al inyectarla al cromatógrafo de líquidos, es de 3.81 min. (Fig. 6b) y que nuevamente éste no aparece en la muestra sin enrique

cer (Fig. 6a).

Como los resultados obtenidos con el maíz chalqueño eran idénticos a los obtenidos con maíz H-32, se pensó en un posible error en el método de extracción, por lo que se procedió a revisar de nueva cuenta la literatura para comparar nuestro método con otros ya conocidos. Además se revisó también con cuidado la pureza de reactivos y disolventes. De esta revisión surgió la idea de probar las siguientes modificaciones al método de extracción^{22,33,35}, haciendo en cada caso la extracción completa y analizando los extractos por HPLC, con el fin de verificar la presencia o ausencia de la señal correspondiente a la zeatina en los extractos de maíz. Las modificaciones se hicieron en muestras de elote.

Así, la primera modificación al método consistió en evaporar los extractos etanólicos a sequedad, a diferencia de como normalmente se hacía, evaporando solo el etanol y dejando el residuo acuoso antes de acidular.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 7.

Muestra	Peso (g)	Extracto (g)
Elote	9.8162	0.0621

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

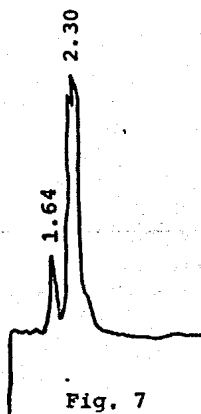


Fig. 7

Elote

t_R (min)	Conc. (%)
1.64	13.9348
2.30	85.1878

Como puede verse en la figura 7 tampoco aparece la señal correspondiente a la zeatina.

La segunda modificación al método, consistió en evaporar los extractos etanólicos a la mitad de su volumen inicial. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 8.

Muestra	Peso (g)	Extracto (g)
Elote	9.9588	0.1065

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

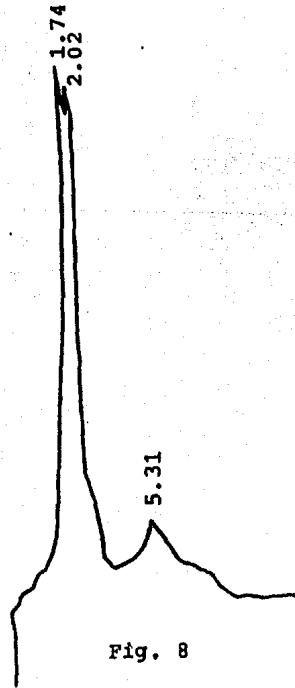


Fig. 8

Elute

t_R (min)	Conc. (%)
1.74	48.6734
2.02	50.7172
5.31	0.5593

En la figura 8 puede verse que tampoco aparece la señal de zeatina, pero si una nueva señal de tiempo de retención de

5.31 min.

La tercera modificación consiste en hacer solo tres lavados con hexano, en lugar de lavar cuantas veces fuera necesario para obtener una fase acuosa libre de residuos, como tradicionalmente se hacía. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 9.

Muestra	Peso (g)	Extracto (g)
Elote	10.1109	0.1205

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

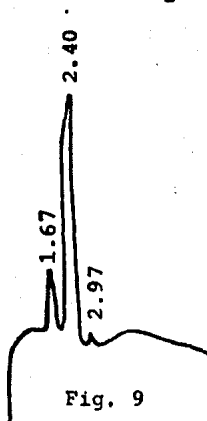


Fig. 9

Elote

t_R (min)	Conc. (%)
1.67	13.9543
2.40	84.1438
2.97	1.9020

En la figura 9 se observa que la zeatina no está presente.

Paralelamente a estas tres modificaciones, se llevó a cabo una extracción de la manera en que normalmente se hacia, a manera de blanco. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 10.

Muestra	Peso (g)	Extracto (g)
Elote	9.9436	0.1291

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

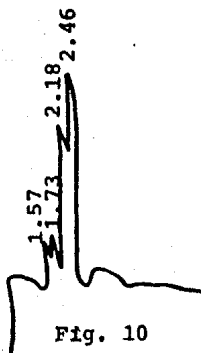


Fig. 10

Elote

t_R (min)	Conc. (%)
1.57	4.7262
1.73	9.0250
2.18	32.8207
2.46	52.9295

La figura 10 tampoco presenta la señal correspondiente a la zeatina.

Con estos resultados obtenidos, tanto de las modificaciones como del método tradicional, se pensó que probablemente el método de extracción no era el correcto, por lo cuál se decidió probar un nuevo método, el propuesto por Vizárová, G. y Vozár, I.³⁴, que ya se ha descrito y que se adaptó de la siguiente manera:

Los granos de maíz se muelen y se extraen dos veces, con etanol al 76% por 20 min.

Los extractos se centrifugan y el sobrenadante se evapora a sequedad al vacío. El

residuo se disuelve en agua y se acidula con HCl 0.1 M a pH=3, la solución se extrae tres veces con 10 ml de éter etílico

cada vez. A la fase acuosa se le ajusta el pH a 8 con NH₄OH 0.1 M y se extrae tres veces con 10 ml de butanol cada vez.

Todas las fracciones butanólicas se combinan y se evaporan a sequedad a 25 mm Hg y 40°C. El residuo final se disuelve en metanol, se filtra y el filtrado se analiza por HPLC.

El siguiente experimento se realizó con el fin de probar

el método de Vizárová y Vozár, usando elote como muestra de extracción.

Con objeto de probar si el método realmente extraía la zeatina presente en el elote, se agregó estándar de zeatina a las muestras antes de iniciar la extracción, haciendo paralelamente la extracción de una muestra sin zeatina. Además las muestras se enriquecieron con estándar en el momento de inyectarlas al cromatógrafo de líquidos (CL). Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 11a a 11e.

Estándar de t-zeatina de concentración 7.3871×10^{-4} M.

Muestra	Peso (g)	Estándar adicionado (μ g)
1. Elote	10.0356	-----
2. Elote	9.9648	0.03239
3. Elote	10.0212	0.08099

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

Muestra No. 1

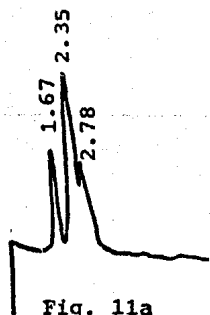


Fig. 11a

Elute

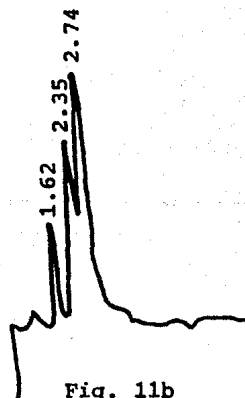


Fig. 11b

Elute enriquecido al
inyectarlo al CL.

t_R (min)	Conc. (%)
1.67	14.3444
2.35	63.3149
2.78	22.0904

t_R (min)	Conc. (%)
1.62	7.2972
2.35	31.8551
2.74	55.6894

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

Muestra No. 3

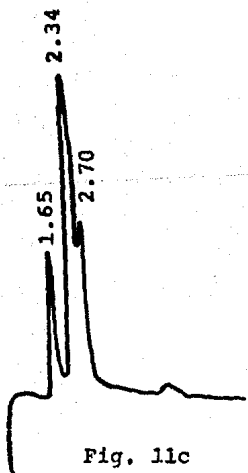


Fig. 11c

Elote con 0,08099 µg de estándar adicionado antes de iniciar la extracción.

t_R (min)	Conc. (%)
1.65	12.0821
2.34	58.6894
2.70	26.2240

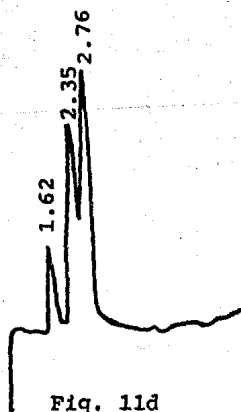


Fig. 11d

Elote con 0,08099 µg de estándar, y enriquecido al inyectarlo al CL.

t_R (min)	Conc. (%)
1.62	9.3461
2.35	39.5078
2.76	49.6087

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

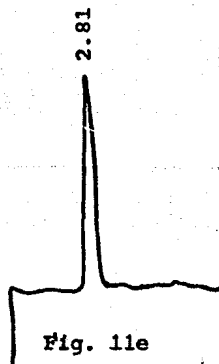


Fig. 11e

Estándar t-zeatina

t_R (min)	Conc. (%)
2.81	96.4920

En esta ocasión el tiempo de retención del estándar de zeatina es de 2.81 min. (Fig. 11e). La figura 11a muestra el extracto de elote sin enriquecer que presenta un pequeño pico con tiempo de retención de 2.78 min., que puede considerarse debido a la zeatina. Para corroborar esto, la misma muestra se enriquece con el estándar al inyectarla al cromatógrafo de líquidos (CL) y se observa en la figura 11b que el pico que aparece con un tiempo de retención de 2.74 min. es mayor que en la figura 11a, lo que nos permite concluir que la zeatina está

presente en el elote y que corresponde a este pico.

La figura 11c representa el extracto de una muestra de elote a la que se le agregó 0.08099 μg de zeatina antes de iniciar la extracción. En este caso la señal con tiempo de retención de 2.70 min., asignada a zeatina, fue ligeramente mayor que la que presenta la muestra sin enriquecer (Fig. 11a). La figura 11d corresponde a una muestra de elote enriquecida con 0.08099 μg de zeatina antes de iniciar la extracción, a la que además se le agregó estándar de zeatina antes de inyectarla al cromatógrafo de líquidos (CL). Como puede verse la señal que aparece con un tiempo de retención de 2.76 min. es mayor que la correspondiente señal de la figura 11c.

Los experimentos descritos arriba también se llevaron a cabo con el método de extracción de Nishinari y Syono¹⁵, obteniéndose los mismos resultados.

De lo anterior puede concluirse que la zeatina está presente en el elote en cantidad suficiente para ser extraída y detectada con la metodología seguida. Aunque lo ideal sería contar con un estándar de zeatina radioactiva para poder determinar la recuperación del método, sin embargo, por los resultados obtenidos, se observa que cuando la zeatina está presente está puede extraerse y cuantificarse.

Con los resultados anteriores queda probado que el método de extracción de Nishinari y Syono, extrae las citocininas pre

sentes en la muestra por lo que la fuente de error debía de estar en otro punto.

Una vez seguros de que los métodos de extracción no presentaban fuente de error, se procedió nuevamente a hacer extracciones en maíz chalqueño con ambos métodos: el propuesto por Nishinari y Syono, y el propuesto por Vizárová y Vozár. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 12a a 12h.

Estándar de t-zeatina de concentración 9.3940×10^{-4} M.

Método	Muestra	Peso (g)	Extracto (g)
Nishinari	chalqueño	10.0366	0.0162
Vizárová	chalqueño	10.0132	0.0149

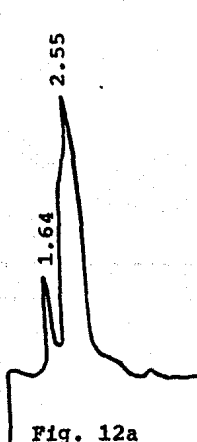
Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

Fig. 12a

Semilla

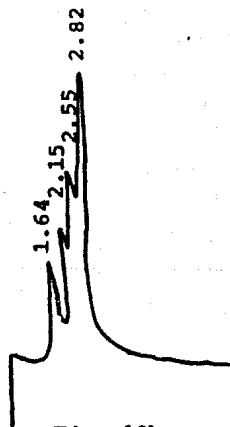


Fig. 12b

Semilla enriquecida

Método de Nishinari

t_R (min)	Conc. (%)	t_R (min)	Conc. (%)
1.64	6.9741	1.64	7.2176
2.55	91.9413	2.15	19.5591
		2.55	28.3224
		2.82	44.3188

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

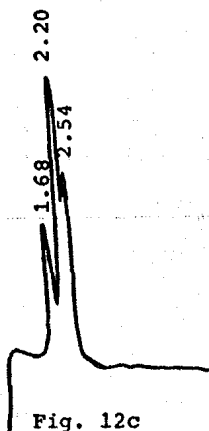


Fig. 12c

Semilla

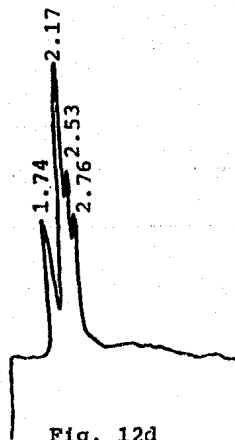


Fig. 12d

Semilla enriquecida

Método de Vizárová

t_R (min)	Conc. (%)	t_R (min)	Conc. (%)
1.68	7.4579	1.74	5.7621
2.20	57.3616	2.17	49.3711
2.54	34.9663	2.53	18.4463
		2.76	26.2517

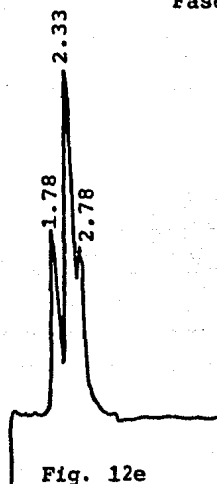
Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

Fig. 12e

Elote

t_R (min)	Conc. (%)
1.78	19.8013
2.33	62.6447
2.78	17.5540

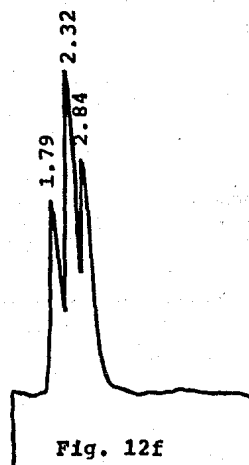


Fig. 12f

Elote enriquecido

t_R (min)	Conc. (%)
1.79	19.1183
2.32	50.2657
2.84	30.5439



Fig. 12g

Estándar t-zeatina

t_R (min)	Conc. (%)
2.84	99.0451

Fase móvil MeOH-H₂O 50:50 v/v

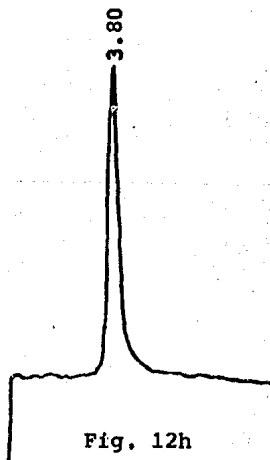


Fig. 12h

Estándar t-zeatina

t_R (min)	Conc. (%)
3.80	98.8849

El tiempo de retención del estándar de zeatina en este caso es de 2.84 min. con fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v (Fig. 12g) y de 3.80 min. con fase móvil MeOH-H₂O 50:50 v/v (Fig. 12h).

Las muestras se enriquecen en el momento de inyectarlas al cromatógrafo de líquidos (CL).

La figura 12a representa el cromatograma de un extracto de maíz chalqueño por el método de Nishinari, sin enriquecer,

mostrando un último pico con tiempo de retención de 2.55 min., muy distante del tiempo de retención del estándar. La figura 12b representa la misma muestra, solo que enriquecida, mostrando un pico adicional de tiempo de retención de 2.82 min. que no aparece en la figura 12a. Ambas muestras se analizaron por HPLC con fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v.

El extracto de la figura 12c se realizó por el método de Vizárová, sin enriquecer la muestra. Presenta tres picos, de los cuales ninguno corresponde al tiempo de retención del estándar. Al enriquecer esta misma muestra, aparece el pico adicional del estándar, con un tiempo de retención de 2.76 min. como se observa en la figura 12d. Al igual que los experimentos anteriores se usó fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v.

Se modificaron las condiciones de la fase móvil a MeOH-H₂O 50:50 v/v, lográndose tan solo una mejor separación de los picos, pero al enriquecer las muestras siempre apareció el pico adicional del estándar con un tiempo de retención de 3.69 min.

Ante estos resultados obtenidos, en los que al parecer no se identificaba a la zeatina en las muestras de maíz, se procedió a inyectar al cromatógrafo de líquidos una muestra de elote, de experimentos anteriores, que se tenía refrigerada. Usándose la misma fase móvil de MeOH-H₂O 70:30 v/v. La figura 12e es de la muestra de elote sin enriquecer, mostrando un tercer

pico con tiempo de retención de 2.78 min., que al enriquecer está misma muestra, figura 12f, ese mismo pico fue mayor, teniendo un tiempo de retención de 2.84 min. Para corroborar que en realidad este tercer pico correspondía a la zeatina, se modificó la fase móvil a MeOH-H₂O 50:50 v/v, y ese mismo pico se guía siendo mayor cuando la muestra había sido enriquecida que cuando no se había enriquecido.

Con los resultados así obtenidos, se concluía que en el caso del maíz la zeatina no se detectaba.

El experimento se repitió bajo las mismas condiciones de extracción y análisis, obteniéndose los mismos resultados ya expuestos en las figuras 12. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 13a y 13b.

Estándar de t-zeatina de concentración 3.9220×10^{-4} M.

Muestra	Peso (g)	Extracto (g)
Chalqueño	20.3102	0.0327

Fase móvil MeOH-H₂O 50:50 v/v

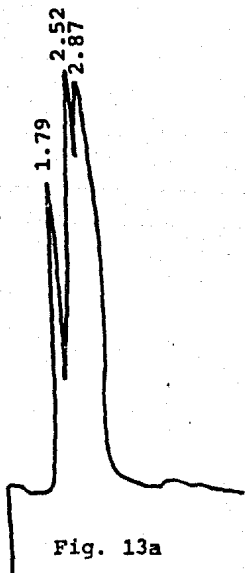


Fig. 13a

Semilla

t_R (min)	Conc. (%)
1.79	9.3141
2.52	23.8334
2.87	24.9499

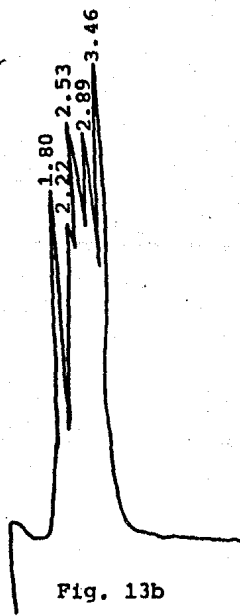


Fig. 13b

Semilla enriquecida

t_R (min)	Conc. (%)
1.80	6.5262
2.22	5.2448
2.53	13.4933
2.89	14.7273
3.46	23.0788

En este experimento se usó como fase móvil MeOH-H₂O 50:50 v/v. El estándar presentó un tiempo de retención de 3.90 min.

En la figura 13a que es de muestra de maíz chalqueño sin enriquecer, presenta solo tres picos, que al compararla con la figura 13b que es la misma muestra solo que enriquecida con el estándar al inyectarla al cromatógrafo de líquidos aparece un nuevo pico que corresponde al estándar, con tiempo de retención de 3.46 min. Nuevamente no se detecta la zeatina en maíz.

Dado los resultados anteriores se decidió probar otro método de análisis, que nos permitiera identificar y cuantificar la zeatina en muestras de extractos de maíz, optándose por la cromatografía de gases (CG).

Para realizar un análisis por cromatografía de gases es necesario hacer un derivado volátil. Este se prepara disolviendo la muestra en 10 a 20 µl de piridina seca, agregándose después una mezcla de BSTFA-TMCS 99:1 [bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida-trimetilclorosilano] y la solución resultante se calienta a 60°C de 30 a 60 min. Con objeto de probar esta técnica se hizo una extracción de maíz chalqueño y el extracto se trató de la manera indicada para obtener el derivado siliado, paralelamente se hizo el derivado del estándar para comparar con el del extracto. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 14a y 14b.

Estándar de t-zeatina en polvo.

Muestra	Peso (g)	Extracto (g)
Chalqueño	20.0531	0.0315

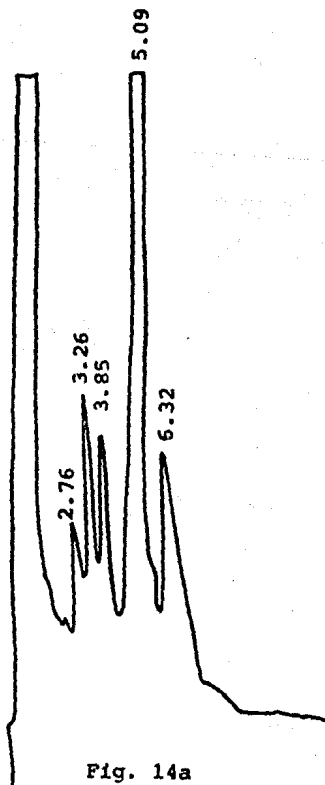


Fig. 14a

Semilla

t_R (min)	Conc. (%)
2.76	3.4398
3.26	8.5310
3.85	5.3384
5.09	77.0201
6.32	5.6707

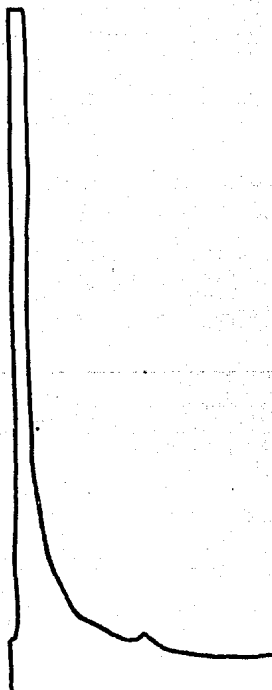


Fig. 14b

Estándar t-zeatina

Los cromatogramas obtenidos no son muy alentadores, debido a que no se obtuvo un buen pico que correspondiera a la zeatina, tanto en el extracto (Fig. 14a) como en el estándar (Fig. 14b), por lo que este método de sililación se descartó.

Sin embargo, se probaron otros métodos de sililación, no obteniendo resultados congruentes. Otro de los métodos proba-

dos fue el siguiente: la muestra se disuelve en piridina seca y se le añade una mezcla de HMDS-TMCS 2:1 (1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano-trimetilclorosilano) como reactivos sililantes³. Con esta técnica se hicieron derivados tanto de un extracto de maíz chalqueño como de estándar de zeatina en polvo. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 15a a 15e.

Estándar de t-zeatina en polvo.

Muestra	Peso (g)	Extracto (g)
Chalqueño	10.4451	0.0153

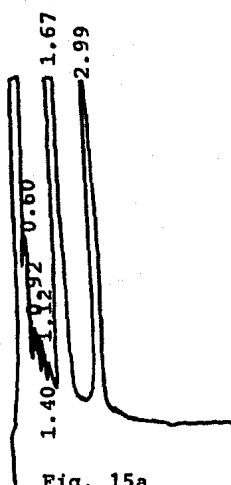


Fig. 15a

Semilla

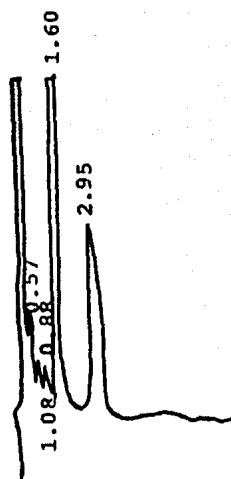


Fig. 15b

Semilla enriquecida

t_R (min)	Conc. (%)	t_R (min)	Conc. (%)
0.60	0.2846	0.57	0.4784
0.92	0.5855	0.88	0.5858
1.12	0.4351	1.08	0.4784
1.40	0.1748	1.60	78.3614
1.67	77.8618	2.95	20.0956
2.99	20.6579		

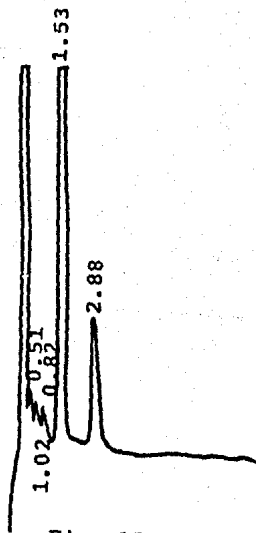


Fig. 15c

Semilla enriquecida	
t_R (min)	Conc. (%)
0.51	0.4276
0.82	0.5547
1.02	0.3814
1.53	78.7794
2.88	19.8566

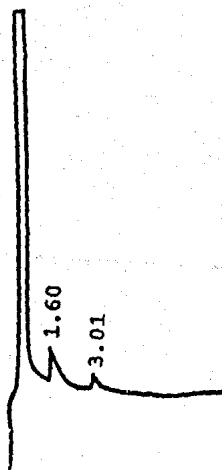


Fig. 15d

Semilla enriquecida	
t_R (min)	Conc. (%)
1.60	76.3598
3.01	23.6401



Fig. 15e

Estándar t-zeatina

La figura 15a representa el derivado sililado de la muestra del extracto de maíz chalqueño, obteniéndose varios picos. Para saber cuál de ellos correspondía a zeatina, se tomó una pequeña cantidad de esta muestra y se le añadió estándar en polvo y más cantidad de reactivos sililantes, obteniéndose el cromatograma presentado en la figura 15b, en el que no se observa el crecimiento de ningún pico en particular, sino que por el contrario, todos los picos disminuyeron de tamaño. Suponiendo que la cantidad de estándar no había sido suficiente,

se añadió aún más cantidad, al igual que de reactivos sililantes, figura 15c. En este caso se obtuvieron picos aún más pequeños que en la figura 15b. A la solución que dió el cromatograma de la figura 15c se le añadió más zeatina y reactivos sililantes. El cromatograma del producto resultante presenta tan solo dos picos pequeños, que se muestran en la figura 15d.

La figura 15e muestra el cromatograma del estándar sililado, que sin embargo, como en el otro método de sililación, tampoco se obtiene una buena señal.

El enriquecer una muestra y analizarla por cromatografía de gases (CG), no daba el crecimiento de un pico específico que correspondiera al estándar, como sucedía cuando la muestra se analizaba por HPLC.

Ante estos resultados negativos, se decide regresar al método de análisis propuesto desde un principio, HPLC y las extracciones hacerlas por los dos métodos ya descritos anteriormente sobre un nuevo genotipo de maíz, TL 81A haciéndose a la par con elote. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 16a a 16c.

Estándar de t-zeatina de concentración 1.4590×10^{-4} M.

Método	Muestra	Peso (g)	Extracto (g)
Vizárová	elote	10.0126	0.0296
Nishinari	elote	20.0230	0.1541
Nishinari	maíz TL 81A	10.0198	0.0082
Vizárová	maíz TL 81A	20.0187	0.0354

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

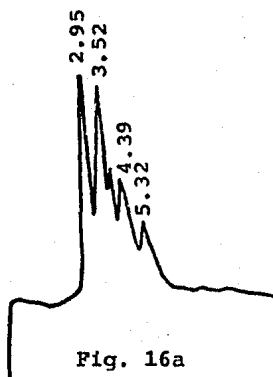


Fig. 16a

Elote

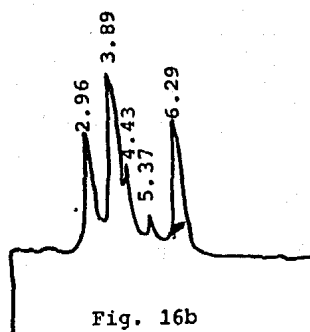


Fig. 16b

Elote enriquecido

Método de Vizárová

t_R (min)	Conc. (%)	t_R (min)	Conc. (%)
2.95	29.3217	2.96	20.8239
3.52	40.7592	3.89	30.6155
4.39	16.3080	4.43	6.6153
5.32	6.4436	5.37	2.8266
		6.29	37.7100

Fase móvil MeOH-H₂O 70:30 v/v

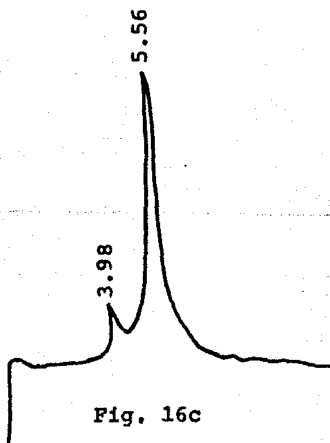


Fig. 16c

Estándar t-zeatina

t_R (min)	Conc. (%)
3.98	8.1859
5.56	90.5073

En este caso el estándar de zeatina presentó dos picos con tiempos de retención de 3.98 min. y 5.56 min. (Fig. 16c), ante este resultado inesperado se inyecta una muestra de estándar de experimentos anteriores obteniéndose el mismo resultado. Pensando en una posible descomposición del estándar se le hace un espectro de masas (Fig. 17), obteniendo el último pico correspondiente a M^+ con un valor de 219, que corresponde al peso molecular de la zeatina, además picos que corresponden a

los valores de las partes fragmentadas integrantes de la molécula de zeatina⁴⁶. Por este resultado se concluía que el estándar no se estaba descomponiendo, aunque presentara dos picos por HPLC.

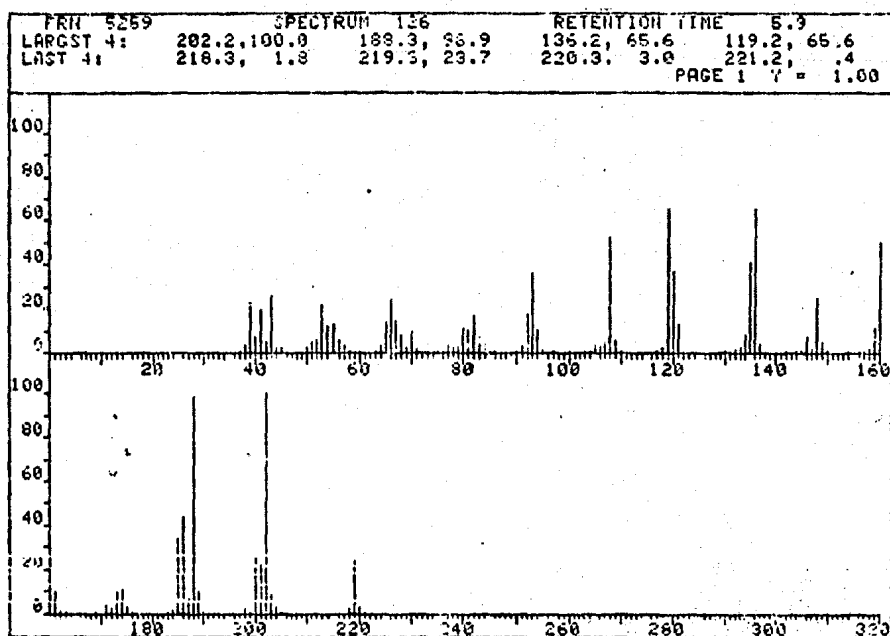


Fig. 17

Estándar t-zeatina

Espectro de masas

La figura 16a representa el extracto de elote, con la aparición de cuatro picos de los cuáles ninguno corresponde a zeatina, como se observa en la figura 16b, que es la misma muestra, solo que enriquecida con zeatina al inyectarla al cromatografo de líquidos, y en la que aparece un pico adicional con tiempo de retención de 6.29 min. que no aparece en la figura 16a. No pudiéndose detectar nuevamente la zeatina.

A este punto del desarrollo de nuestro trabajo, quedó instalado en la División de Estudios de Posgrado un instrumento de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM), abriéndonos la posibilidad de utilizar este tipo de técnicas que son extremadamente sensibles.

En una revisión hecha anteriormente a la literatura, se encontró reportado el trabajo de MacLeod, J.K. et al⁴ en el que analizan derivados sililados de citocininas por CG-EM, mostrando además los espectros de masas obtenidos para dos citocininas conjugadas, es decir unidas a un azúcar en diferente posición. Tomando como base éste trabajo se llevó a cabo otra extracción con elote y maíz chalqueño, de éste último en semilla completa, eje embrionario y escutelo, usando el doble de cantidad inicial para evitar una posible fuente de error, es decir, que sea poca la cantidad de zeatina extraída y no se alcance a detectar.

La extracción de las muestras se hizo por el método de Ni

shinari y Syono³⁵, y los derivados sililados con piridina seca y HMDS-TMCS (1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano-trimetilclorosilano)⁴³. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 18a a 18d.

Muestra	Peso (g)	Extracto (g)
Elote	20.0271	0.0646
Chalqueño		
semilla	19.9927	0.0270
eje embrionario	1.6190	0.0719
escutelo	11.8228	0.0666

} lo obtenido
} de 200.0744 g
} de semilla

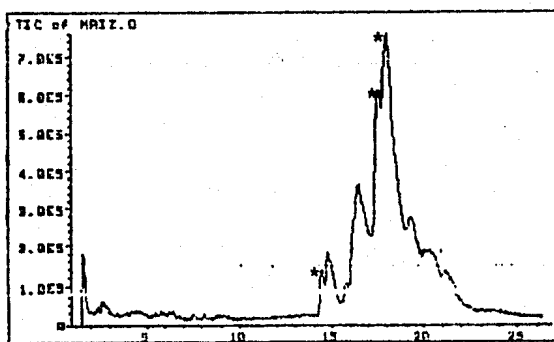


Fig. 18a

Eje embrionario

* picos analizados por EM

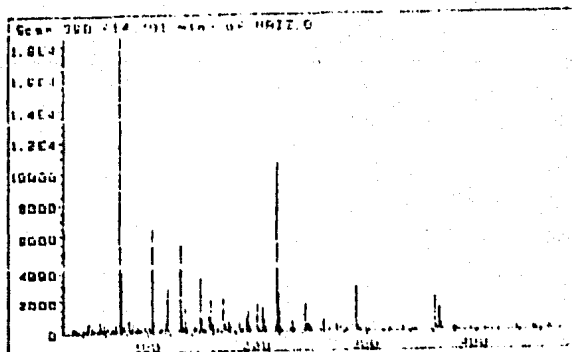


Fig. 18b

Scan 360 (14.401 min) of MAIZ.D

EJE EMBRIONARIO

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
30.75	1	97.95	1	150.15	1	215.15	1
32.00	1	99.05	1	151.00	1	217.15	57
41.00	1	99.95	1	155.15	4	218.15	13
43.00	2	101.05	5	156.15	1	219.15	6
44.00	1	101.95	1	157.00	10	220.25	1
45.30	3	103.05	34	158.00	3	220.25	1
46.90	1	104.05	3	159.00	2	231.15	3
53.20	1	105.05	3	163.00	1	233.15	1
54.95	3	109.05	2	169.00	12	243.25	8
56.80	1	110.95	1	170.15	2	244.15	2
58.20	1	112.95	1	171.15	4	245.25	2
58.95	2	115.05	1	173.15	3	247.30	1
59.80	1	116.05	3	175.00	1	248.05	1
61.05	1	117.05	15	177.15	1	259.20	3
67.30	1	118.05	1	183.15	2	260.05	1
69.05	3	119.05	1	185.00	1	271.05	2
73.05	100	127.05	2	187.00	1	273.20	1
74.05	8	129.05	28	189.15	4	275.05	1
75.05	21	130.22	4	190.00	1	289.20	15
76.05	1	131.05	6	191.15	6	290.20	3
77.05	2	132.20	2	192.15	1	291.05	1
81.05	4	133.05	7	193.25	1	302.30	1
82.05	1	134.20	1	199.15	9	301.25	11
83.20	1	141.20	1	200.15	2	302.15	3
85.35	3	142.05	4	201.15	1	303.25	1
89.05	3	143.05	1	202.15	1	309.25	7
91.25	1	144.20	1	204.15	7	300.25	2
92.95	1	145.20	6	205.15	3	307.25	1
95.05	1	147.15	19	206.25	1	437.40	1
95.95	1	148.15	3	207.00	1	451.20	1
97.05	1	149.00	4				

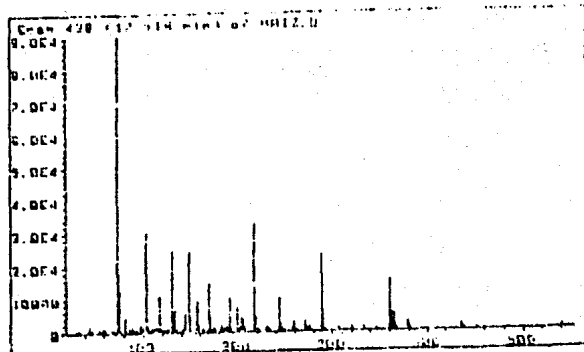


Fig. 18c

Scan 438 (17.518 min) of MAIZO
EJE EMBRIONARIO

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
45.00	1	129.05	27	175.15	1	245.05	2
54.95	1	130.20	3	183.15	2	247.05	1
58.95	1	131.05	6	185.15	1	259.05	2
68.95	2	132.20	1	189.15	4	271.20	3
73.05	100	133.05	6	191.15	11	272.05	1
74.05	3	134.05	1	192.15	1	273.05	1
75.05	14	141.05	1	199.15	9	275.20	1
76.95	1	142.20	2	200.15	1	288.20	1
81.05	4	143.05	6	203.00	1	289.20	25
85.05	2	144.05	1	204.15	5	290.20	6
89.05	1	145.20	5	205.15	3	291.20	2
97.05	2	147.15	26	207.15	1	319.20	1
101.05	2	148.15	4	215.15	1	332.20	1
103.05	33	149.00	4	217.15	35	361.25	16
104.05	3	155.00	3	218.15	8	362.25	5
105.05	1	157.00	10	219.15	4	363.25	3
109.05	1	158.15	2	221.15	1	364.25	1
113.05	1	159.15	1	229.15	1	365.15	5
115.05	1	163.15	1	230.15	1	366.25	1
116.20	1	169.15	16	231.15	2	370.25	1
117.05	12	170.15	2	233.15	1	379.25	2
118.05	1	171.15	3	243.15	10	389.25	1
119.05	1	173.15	2	244.15	2	437.25	1
127.05	2						

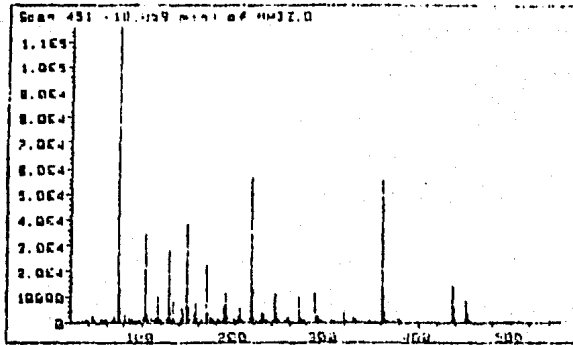


Fig. 18d

Scan 451 (10.059 min) of MAIZ.D
EJE ENBRIDNARIO

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
45.05	2	130.05	3	192.15	1	272.05	2
54.05	1	131.05	4	199.15	3	273.20	1
68.05	2	133.05	7	203.15	1	289.20	9
73.05	100	142.05	1	204.15	5	290.20	2
74.05	8	143.05	4	205.15	3	291.20	1
75.05	10	145.05	3	206.15	1	305.20	1
91.05	2	147.05	3	207.15	1	319.20	3
85.05	1	148.15	4	215.15	1	320.20	1
88.05	1	149.05	4	217.15	40	331.20	1
97.05	1	155.15	2	218.15	10	361.15	47
101.05	2	157.05	6	219.15	4	362.25	15
103.05	30	159.15	1	221.15	1	363.25	8
104.05	2	159.05	1	229.15	2	364.25	1
105.05	1	163.15	1	230.15	2	365.15	2
109.05	1	169.15	19	231.15	2	379.25	1
113.05	1	170.15	2	243.15	9	437.25	11
115.05	1	171.15	2	244.15	2	438.40	4
116.05	1	173.15	1	245.05	2	439.30	2
117.05	8	183.05	1	247.20	1	450.30	1
119.05	1	189.15	4	257.20	1	451.30	6
127.05	2	190.15	1	259.20	1	452.30	3
129.05	24	191.15	9	271.05	5	453.30	1

Primeramente se analizó la muestra del eje embrionario, observándose en la figura 18a la aparición de ocho picos por cromatografía de gases, de los cuáles solo tres se analizaron por espectrometría de masas: el de tiempo de retención de 14.401 min. (Fig. 18b), el de tiempo de retención de 17.518 min. (Fig. 18c) y el de tiempo de retención de 18.059 min. (Fig. 18d).

El espectrómetro de masas se programó hasta un valor de masa/carga (m/c) de 500, ya que los valores de las partes fragmentadas de las moléculas esperadas eran menores a éste valor. El análisis por espectrometría de masas de los tres picos seleccionados, no pudo ser completo ya que se obtenían valores de m/c superiores al valor programado, pero los tres espectros de masas presentan ciertas semejanzas entre sí, por lo que se puede concluir que se trata de una serie de compuestos que contienen en su molécula una misma estructura base (adenina) y que además, por tener valores grandes de m/c, se puede suponer que se encuentran unidos a un azúcar, es decir, aparentemente las citocininas que se extraen no son las libres sino las conjugadas.

Comparando los espectros de masas obtenidos (aunque incompletos), con los reportados por MacLeod⁴⁴, se puede asegurar que las citocininas extraídas por el método de Nishinari y Syo no se encuentran unidas a un azúcar, ya que se observan valo-

res correspondientes a las partes fragmentadas con este tipo de molécula.

Desgraciadamente en este punto del trabajo, el instrumento de CG-EM sufrió un desperfecto que requería de mucho tiempo para su reparación, lo que nos impidió completar este experimento y repetirlo con otras muestras. Sin embargo, los resultados obtenidos parecen muy alentadores y podrían explicar algunos de los resultados contradictorios obtenidos por HPLC, ya que si, con el método de extracción usado, se extrae una mezcla de citocininas libres y conjugadas, dependerá en cada caso, del tipo de carbohidrato (pentosa o hexosa) asociado a la citocinina, el tipo de respuesta que se obtenga en el cromatógrafo, haciendo que los resultados sean difíciles de reproducir.

Con la técnica de CG-EM se abre la posibilidad de poder identificar las citocininas libres o las citocininas conjugadas que se encuentran en el extracto, sin necesidad de contar con todos los estándares.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN Y CONCLUSIONES

- Se revisó ampliamente la literatura, en lo referente a métodos de extracción y análisis de citocininas.

- El método de Nishinari y Syono se adaptó a la extracción de citocininas a partir de maíz (elote y semilla seca).

- Se comparó el contenido de citocininas en maíz de genotipo H-32 tanto en semilla completa como en el embrión. Los resultados indicaron que la t-zeatina se encuentra concentrada en el embrión.

- Se cuantificaron las citocininas en las partes integrantes del embrión, encontrándose que el 85% de ellas se concentra en el eje embrionario y el restante 15% en el escutelo.

- Surgieron resultados contradictorios con el método de extracción seguido, por lo que se prueba otro método, el propuesto por Vizárová y Vozár, que al igual que con el método de extracción de Nishinari y Syono, se encontró que la t-zeatina solo se podía identificar en muestras de elote, mientras que en semilla de maíz seco no se detectó.

Se probó otra técnica de análisis, la cromatografía de gases (CG), para la que previamente se debía de hacer un deri-

vado sellado de la muestra, no dando buenos resultados.

- Se intentó el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), que permite concluir que las citocininas extraídas por el método seguido, son las conjugadas, por los valores grandes de masa/carga que se obtienen en los espectros de masas.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Wareing, P.F. and Phillips, I.D.J. The control of growth & differentiation in plants. pag. 62, 251. First edition. Pergamon Press. Great Britain (1970).
2. Davis, G.C. et al. Anal. Chem. 57, 638A (1985).
3. Hill, T.A. Endogenous plant growth substances. pag.1, 29. First edition. Clowes & Sons. Great Britain (1973).
4. Davies, D.D. et al. Bioquímica vegetal. pág. 465. Primera edición. Editorial Omega. España (1969).
5. Greulach, V.A. y Adams, J.E. Las plantas. Introducción a la botánica moderna. pág. 234. Primera edición. Editorial Limusa. México (1970).
6. Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. The germination of seeds. pag. 21. Second edition. Pergamon Press. Great Britain (1975).
7. Wilkins, M.B. Physiology of plant growth and development. pag. 55, 605. TMH edition. McGraw-Hill. India (1969).

8. Leshem, Y. The molecular and hormonal basis of plant-growth regulation. pag. 141. First edition. Pergamon Press. Great Britain (1973).
9. Simpson, G.M. Water stress on plants. pag. 127,176. First edition. Praeger. USA (1981).
10. Wareing, P.F. and Phillips, I.D.J. Growth & differentiation in plants. pag. 51. Third edition. Pergamon Press. Great Britain (1981).
11. Elliott, D.C. Plant Physiol. 63, 264 (1979).
12. Fletcher, R.A. et al. Plant Physiol. 69, 675 (1982).
13. Weiler, E.W. Planta 149, 155 (1980).
14. Horgan, R. Prog. Phytochem. 7, 137 (1981).
15. Weiler, E.W. and Spanier, K. Planta 153, 326 (1981).
16. Barthe, G.A. and Stewart, I. J. Agric. Food Chem. 33, 293 (1985).
17. Brenner, M.L. Ann. Rev. Plant Physiol. 32, 511 (1981).
18. Wilcox, E.J. and Wain, R.L. Ann. appl. Biol. 84, 403 (1976).
19. Pickering, W.F. Química analítica moderna. pág. 642. Primera edición. Editorial Reverté. España (1976).
20. Ernstsen, A. and Jensen, E. J. Liq. Chromatogr. 8, 369 (1985).
21. Fritz, J.S. y Schenk, G.H. Química analítica cuantitativa. pág. 445. Tercera edición. Editorial Limusa. México (1979).

22. Thomas, T.H. et al. Plant Physiol. 56, 410 (1975).
23. Horgan, R. Semin. Ser.-Soc. Exp. Biol. 4 (Isol. Plant Growth Subst.), 97 (1978).
24. Holland, J.A. et al. J. Chromatogr. 166, 545 (1978).
25. Andersen, R.A. and Kemp, T.R. J. Chromatogr. 172, 509 (1979).
26. Horgan, R. and Kramers, M.R. J. Chromatogr. 173, 263 (1979).
27. Willard, H.H. et al. Instrumental methods of analysis. pag. 455. Fifth edition. D. Van Nostrand. New York (1974).
28. Young, H. Anal. Biochem. 79, 226 (1977).
29. Most, B.H. et al. J. Chromatogr. 38, 136 (1968).
30. Hahn, H. Physiol. Plant. 34, 204 (1975).
31. Dauphin, B. et al. Planta 144, 113 (1979).
32. Tegelman, A.J. Plant Science Letters 14, 259 (1979).
33. Taylor, J.S. and Simpson, G.M. Can. J. Bot. 58, 1016 (1980).
34. Vizárová, G. and Vozár, I. Biochem. Physiol. Pflanzen 179, 767 (1984).
35. Nishinari, N. and Syono, K. Plant & Cell Physiol. 21, 383 (1980).
36. Nishinari, N. and Syono, K. Plant & Cell Physiol. 21, 1143 (1980).

37. Biddington, N.L. and Thomas, T.H. J. Chromatogr. 75, 122 (1973).
38. Bielecki, R.L. Anal. Biochem. 9, 431 (1964).
39. Letham, D.S. Phytochemistry 12, 2445 (1973).
40. Miller, C.O. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 334 (1974).
41. Biddington, N.L. and Thomas, T.H. J. Chromatogr. 121, 107 (1976).
42. Mousdale, D.M.A. and Knee, M. J. Chromatogr. 177, 398 (1979).
43. Weiss, A.H. and Tambawala, H. J. Chromatogr. Science 10, 120 (1972).
44. MacLeod, J.K. et al. J. Org. Chem. 41, 3959 (1976).
45. Klebe, J.P. et al. J. Am. Chem. Soc. 88, 3390 (1966).
46. Gehrke, C.W. and Leimer, K. J. Chromatogr. 53, 201 (1970).
47. DeJongh, D.C. et al. J. Am. Chem. Soc. 91, 1728 (1969).
48. Harborne, J.B. Phytochemical methods. pag. 1. First edition. Chapman and Hall. Great Britain (1973).