



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ACCION DEL ACIDO GIBERELICO EN LA BIOSINTESIS
DE AMILASAS EN SEMILLAS DE ALGUNAS RAZAS DE
MAIZ MEXICANO"

FRANCISCO JOSE FLORES PASTRANA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOL.OGO

1977



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS. _____

TESIS

1977

ADQ. _____

Mt. ~~118~~

FECHA _____

199

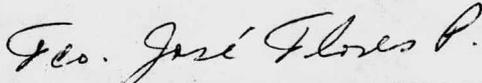
PROC. _____



QUIMICA

PRESIDENTE Prof. MA. GUADALUPE VELEZ PRAT
VOCAL Prof. ALEJANDRO BLANCO LABRA
SECRETARIO Prof. MA. DOLORES LASTRA AZPILICUETA
1er. SUPLENTE Prof. LUIS ENRIQUE SANCHEZ SALOMA
2o. SUPLENTE Prof. VICTORIA VALLES BOURGES

Sitio donde se desarrolló el tema: Departamento de Bioquímica, División de Estudios Superiores, Facultad de Química, U.N. A.M.


SUSTENTANTE: FRANCISCO JOSE FLORES PASTRANA


ASESOR DEL TEMA: Dr. ALEJANDRO BLANCO LABRA

A mis seres queridos.

Agradezco el cariño, la orientación y los consejos que me brindaron durante toda mi carrera:

Dr. Alejandro Blanco

M. en C. Rubén Berra

Biol. Imelda Florencia

Q.F.B. Estela Ruiz

Biol. Armando Rosas

Quím. Gustavo Garduño

Quím. Marcela Cejudo

Dra. Ma. Dolores Lastra

Dra. Guadalupe Velez

Dra. Magdalena Acosta

Dra. Magdalena Oliva

Dra. Estela Sánchez

Dra. Angelina Quintero

M. en C. Victoria Valles

Dr. Joe Varner

Dr. Richard Dilley

Dr. Keith Varty

Q.F.B. Paulina Castro

Q.F.B. Elda Peniche

Dr. Joel Tejeda

Dr. Javier Garfias

Dra. Ma. Luisa Ortega

Abreviaciones.

Ag3	ácido giberélico
ATA	ácido indol acético
ABA	ácido abscísico
CK	citocininas
RE	retículo endoplásmico
CPCh	Colegio de Postgraduados de Chapingo
2,4-D	ácido 2,4-dicloro fenoxiacético
AMCP	ácido 4-cloro -2- metil fenoxiacético
IPA	isopentenil adenosina
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ADN	ácido desoxirribonucleico
ANPc	adenosín monofosfato cíclico

I N D I C E .

I.-	Objetivo	Pág.
II.-	Antecedentes	Pág.
1.-	Las semillas de cereales	Pág.
2.-	Metabolismos de las semillas de Maíz du- rante la germinación	Pág.
	Amilasas y catabolismo del almidón . . .	Pág.
3.-	Fito-hormonas	Pág.
a.-	El Acido Giberélico	Pág.
b.-	Las Citocininas	Pág.
c.-	Las Auxinas	Pág.
d.-	El Acido Abscísico	Pág.
III.-	Materiales	Pág.
1.-	Aparatos	Pág.
2.-	Reactivos	Pág.
3.-	Semillas de Maiz utilizadas	Pág.
IV.-	Métodos y Resultados	Pág.
1.-	Determinación cualitativa del efecto del AG3 sobre la actividad amilolíti- ca de diferentes semillas de Maíz . . .	Pág.

a.- Disección de las semillas	Pág.
b.- Método de esterilización	Pág.
c.- Incubación de las semillas	Pág.
d.- Difusión de las amilásas	Pág.
e.- Revelado de los geles	Pág.
f.- Interpretación de los resultados	Pág.
g.- Resultados obtenidos	Pág.
2.- Determinación cualitativa del efecto del AG3 sobre la actividad amilolítica de diferentes tejidos de Maíz - H-28	Pág.
a.- Procedimiento	Pág.
b.- Resultados obtenidos	Pág.
3.- Estudio de la respiración de capas de aleurona de Maíz H-28	Pág.
a.- Procedimiento	Pág.
b.- Resultados obtenidos	Pág.
4.- Selección de tres diferentes semillas que se utilizaron en los estudios cuantitativos.	Pág.
a.- Maíz H-28	Pág.
b.- Maíz Opaco - 2	Pág.

c.- Maíz Palomero	Pág.
5.- Determinación cuantitativa del efecto del AG3 sobre la actividad amilolítica	Pág.
a.- Disección de las semillas	Pág.
b.- Método de esterilización	Pág.
c.- Incubación en medio líquido	Pág.
Descripción del medio.	
Condiciones de incubación.	
Procedimiento.	
d.- Extracción enzimática	Pág.
e.- Método de Nelsson para la determinación de - la actividad amilolítica	Pág.
Preparación de las soluciones de ensayo	Pág.
Procedimiento	Pág.
f.- Resultados obtenidos	Pág.
6.- Determinación de la capacidad de respiración de aleuronas de Maíz H-28 incubadas en medio líquido	Pág.
a.- Procedimiento	Pág.

b.- Resultados obtenidos.....	Pág.
7.- Determinación de la actividad amilolítica de semi llas en germinación.....	Pág.
a.- Procedimiento.....	Pág.
b.- Resultados obtenidos.....	Pág.
V.- Conclusiones y discusión general.....	Pág.
VI.- Bibliografía.....	Pág.

I.- Objetivo.

Estudiar la producción de amilasas durante la germinación y observar cual es el papel que juega el Acido Giberélico en este importante proceso metabólico de las semillas, estableciendo posibles correlaciones entre los niveles de esta hormona y las diferentes -- características genéticas de las semillas estudiadas.

II.- Antecedentes.

1.- Las semillas de cereales.

Una semilla seca es un organismo vegetal en potencia; sus niveles de agua son únicamente de cinco a diez por ciento y por lo tanto, su metabolismo es muy lento.

De la semilla seca se puede hacer la extracción acuosa de un número considerable de sistemas enzimáticos. Se puede decir que es una unidad funcional capaz de llevar a cabo un gran número de reacciones bioquímicas, una vez que sus proteínas enzimáticas se han hidratado.

En general, para que una semilla germine, se requieren tres factores principales: Humedad, Oxígeno y Temperatura. Sin embargo, hay semillas que a pesar de estar expuestas a estas condiciones, no germinan, y se les conoce como semillas latentes.

Su estudio ha contribuido a esclarecer muchos aspectos importantes de la regulación de la germinación.

Existen una serie de condiciones que pueden ser la causa de que una semilla sea latente.

- Cubierta dura.- Es una barrera mecánica que impide la expansión del embrión así como la hidratación de la semilla y la libre entrada de oxígeno.

- Inhibidores de la germinación.- Por ejemplo el Acido Abscísico.
- Requerimiento de luz u oscuridad.- Hay algunas semillas cuya germinación es inhibida por la luz.
- Embrión incompleto por algún problema durante la embriogénesis.
- Requerimiento de un período de almacenamiento en seco o en frío.
- Balance adecuado de los niveles hormonales.

Por lo tanto, cuando una semilla germina es porque ha encontrado las condiciones óptimas para todos los factores que se han mencionado.

En la tabla 1 se muestran las temperaturas óptimas de germinación de algunos cereales.

Tabla 1

Rangos de temperatura de germinación.

	Mínimo (°C)	Optimo (°C)	Máximo (°C)
<u>Zea Mays</u>	8-10	32-35	40-44
<u>Triticum sativum</u>	3-5	15-31	30-43
<u>Secale cereale</u>	3-5	25-31	30-40
<u>Avena sativa</u>	3-5	25-31	30-40

Estructura y composición de la semilla de Maíz.

Las diferentes semillas de Maíz presentan muchas diferencias morfológicas, pero tienen una estructura en común:

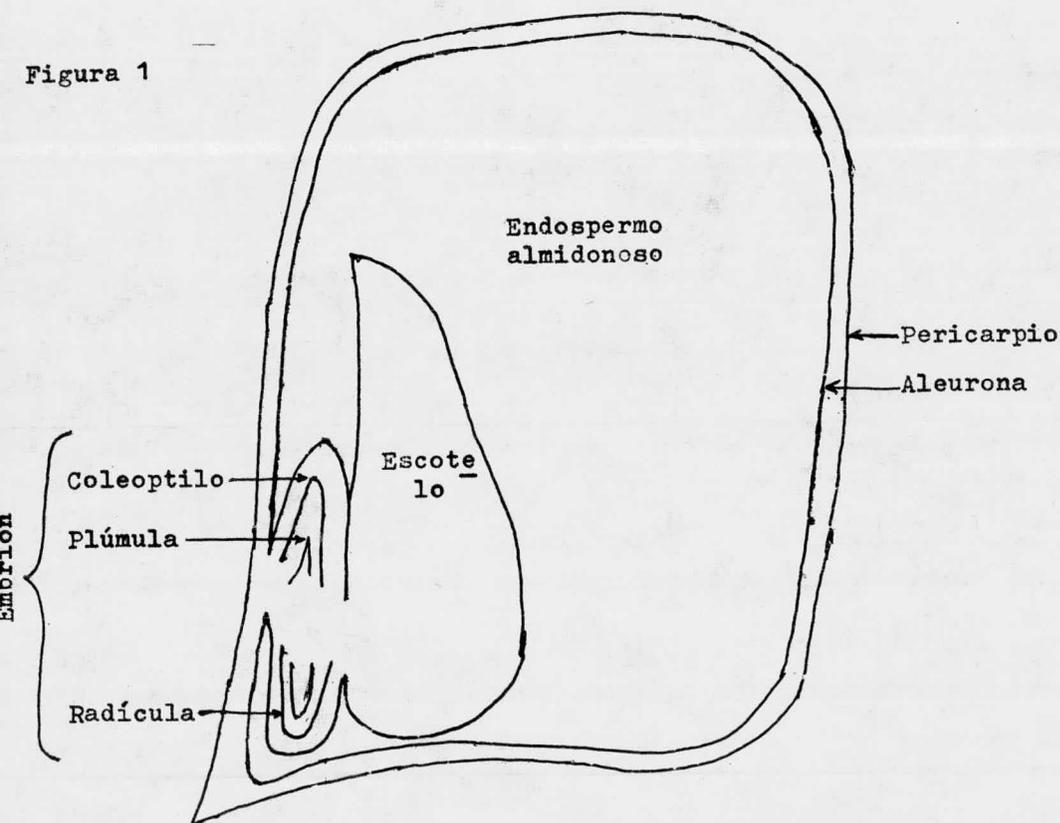
- Un tejido externo o pericarpio que cubre y protege a la semilla. Aparentemente no tiene actividad metabólica durante la germinación.
- La capa de Aleurona. Es un conjunto de células vivas que tienen muy baja actividad metabólica durante el estado latente, pero una vez que se hidratan adquieren máxima importancia, pues son el sitio donde se secretan y sintetizan gran cantidad de complejos enzimáticos, durante las primeras etapas de la germinación.
- El Endospermo Almidonoso que es un tejido cuyas células almacenan grandes cantidades de almidón durante la embriogénesis, es un tejido de reserva cuyos sustratos al ser catabolizados van a proporcionar los metabolitos y la energía necesarias durante la germinación.

El Embrión, que dará origen a la raíz, el tallo y las hojas de la nueva plántula. Es en este órgano donde se sintetizan y se secretan las hormonas, que difundiendo a través del endospermo almidonoso, serán capaces de regular los procesos de producción de enzimas en la aleurona.

- El Escotelo. Puede considerarse como un tejido de relación entre el endospermo almidonoso, el embrión y la aleurona. - A través de sus conductos difunden hormonas y el embrión -- toma los metabolitos que necesita para su rápido crecimiento, en las primeras etapas de la germinación.

La figura 1 es un corte longitudinal de una semilla de -- Maíz, que ilustra la disposición de los tejidos que se han descrito.

Figura 1



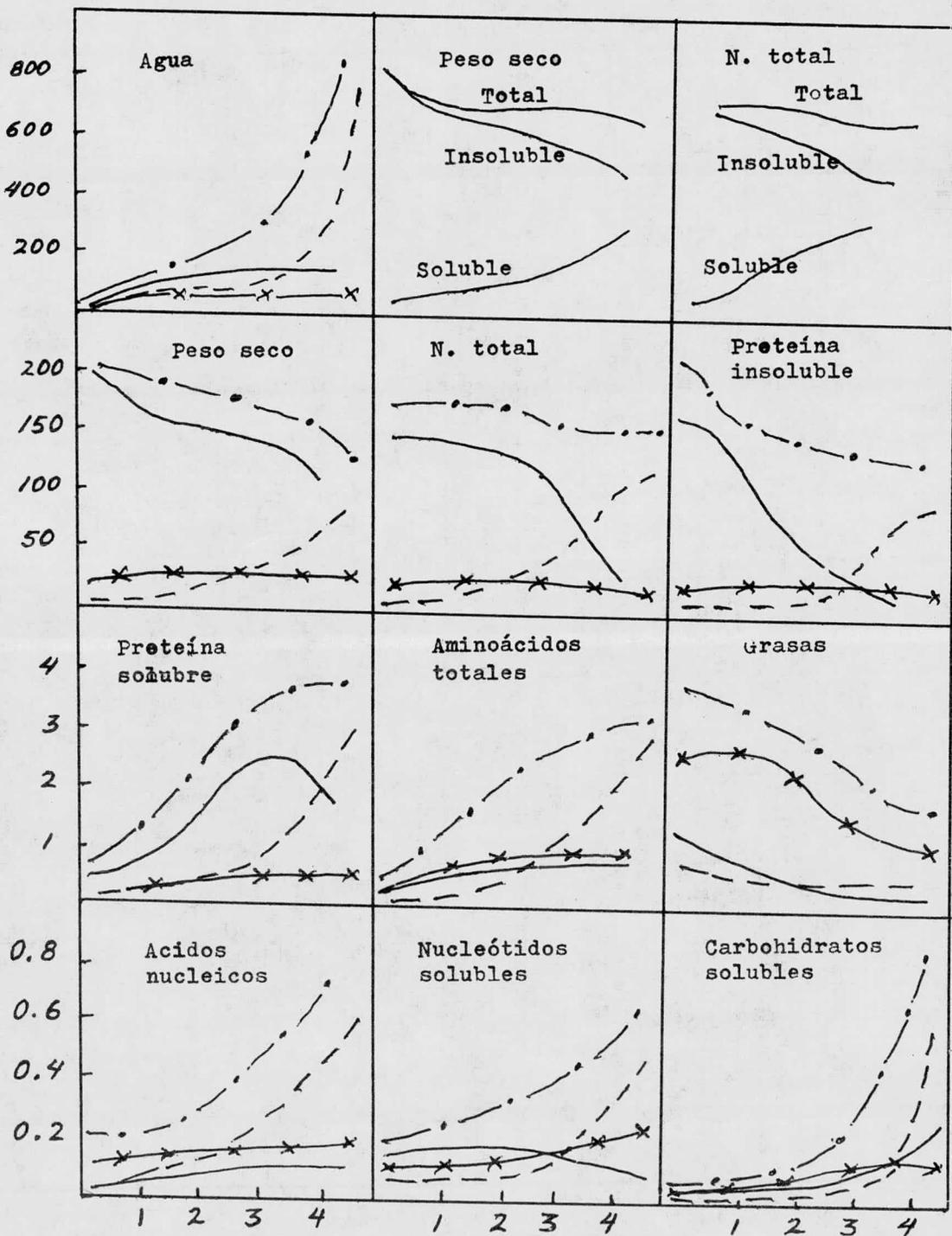
Zea mays

La tabla 2 muestra la composición química del Maíz, comparada con trigo y chícharo,

Tabla 2

Composición química de diferentes cereales.

	% en peso seco			
	Almidón	Azúcares	Proteínas	Grasas
<u>Zea Mays</u>	50 - 70	1 - 4	10	5
<u>Triticum sp</u>	60 - 75	-	13.3	2
<u>Pesum sativum</u>	30 - 40	4 - 6	20	2



En la figura 3 se presenta una secuencia cronológica de los procesos que ocurren durante la germinación.

Figura 3

Activación de enzimas preformadas.

Síntesis y secreción de enzimas degradativas.

Acción de hormonas y otras moléculas preexistentes.

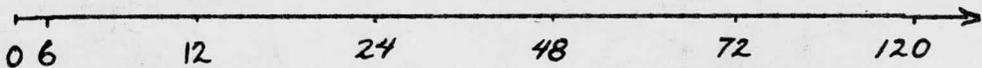
Degradación de materiales de reserva.

Síntesis de ácidos nucleicos. 

Iniciación de la síntesis de proteínas.

Translocación de metabolitos.

Aumento de los niveles hormonales. 



Horas de germinación

Procesos tempranos
(poco estudiados)

ocurren principalmente en el embrión.

Procesos tardíos

(se han estudiado con más detalle)

ocurren en aleurona, endospermo almidonoso y embrión.

En consecuencia, los eventos metabólicos tempranos y tardíos desencadenan infinidad de cambios estructurales y fisiológicos que promueven el desarrollo de la plántula en germinación.

Amilasas y Catabolismo del almidón.

La ruptura del almidón es la principal vía del metabolismo de carbohidratos durante la germinación.

El almidón es un polímero de la glucosa que constituye más del ochenta por ciento del endospermo almidonoso de las semillas de Maíz. El producto final de su degradación es la glucosa, molécula que utiliza el embrión como principal fuente de energía durante los primeros días de germinación.

La hidrólisis enzimática es el mecanismo más importante de degradación del almidón en las semillas, y las enzimas responsables son las alfa y beta amilasas. La Comisión Internacional de Enzimas las clasificó dentro del grupo tres, que corresponde a las hidrolasas, y les asignó un número y un nombre completo:

Alfa amilasa 3.2.1.1. alfa -1,4 glucan -4 glucano hidrolasa.

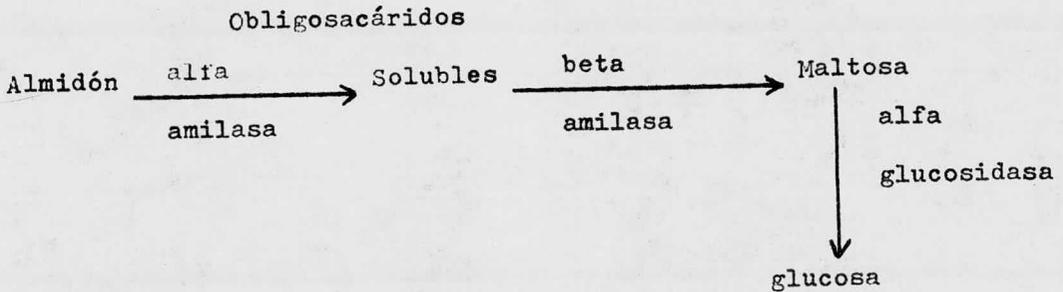
Beta amilasa 3.2.1.2. alfa -1,4 glucan - malto hidrolasa.

Las alfa amilasas son endoenzimas que hidrolizan al azar las uniones glucosídicas alfa (1 - 4) del almidón, la amilosa, la amilopectina y el glucógeno, en tanto que las beta amilasas son exoenzimas que hidrolizan las uniones, alfa (1 - 4), pero en forma ordenada y de dos en dos moléculas de glucosa (de maltosa en maltosa), cesando su acción cuando se aproximan a las uniones beta (1-6) del sustrato, es decir, a una ramificación. Esto implica que la hidrólisis por beta amilasa rinde maltosa y que en el caso de alfa amilasa, los productos son una mezcla de azúcares reductores incluyendo maltosa y glucosa.

Las amilasas de Maíz son inactivadas irreversiblemente por ácidos y bases concentradas. Su PH óptimo es 4.8 - 5.0, son estabilizadas por iones calcio y resisten temperaturas de sesenta grados Celsius.

Alexandrescu (1972), mediante estudios inmunoquímicos demostró que las alfa amilasas de Maíz se presentan en cuatro formas isoenzimáticas hasta el quinto día de germinación, y Labansat (1975) utilizando cromatografía de afinidad, encontró cuando menos dos formas isoenzimáticas para beta amilasa.

Wain (1966) sugiere que en las semillas de chícharo, el almidón sufre la siguiente vía de hidrólisis:



En general se acepta que este mecanismo sea muy parecido al -- que ocurre en las semillas de Maíz.

La semilla seca de Maíz contiene principalmente beta amilasa y el incremento en la actividad amilolítica durante la germinación -- se debe principalmente a alfa amilasa, la cual representa un noventa por ciento de la actividad amilolítica total cuando ésta alcanza su máximo, entre el sexto y el octavo días de germinación.

Kirshop (1957) demostró que en algunos cereales el incremento en la actividad amilolítica depende del embrión. El factor embriionario resultó ser el ácido Giberélico, que difunde a través del escotelo y del endospermo almidonoso hasta la aleurona, donde estimula la síntesis de novo y la secreción de alfa amilasa (Varner 1965)

En 1974 y 1975, Harvey y Goldstein observaron que el Maíz no --

depende del embrión para la producción de alfa amilasa aunque algunas variedades de Maíz enano (d5) si dependen del embrión o de AG3 exógeno para expresar su total actividad amilolítica (Harvey-1974). Se ha sugerido que este fenómeno se debe a que el Maíz ena no carece de suficientes giberelinas endógenas.

Aparte de alfa amilasa, la aleurona secreta otras enzimas que participan en el catabolismo de carbohidratos. Entre ellas están la maltasa (Briggs, 1963), laminarasa (Hagjor, 1966) y beta 1,3 - glucanasa (Pollard, 1969). La degradación parcial de la pared celular de las células de aleurona por la beta 1,3- glucanasa, parece ser un requerimiento para la secreción de alfa amilasa (Taiz, 1970).

El mecanismo por el cual las células de aleurona secretan alfa amilasa, es un punto muy discutido. En 1962, Millar sugirió que -- hay unas partículas, de aspecto muy semejante a los lisosomas, -- que al parecer están involucradas en este proceso. Posteriormente Paleg (1970) y Vigil (1973) obtuvieron micrografías electrónicas que muestran que cuando las células de aleurona son tratadas con AG3, aparecen pequeñas vesículas, a las que se llamó "granos de aleurona".

Price (1970), Colborne (1974) y Paleg (1975) han demostrado -- que la ribonucleasa y las alfa amilasas son secretadas por los -- granos de aleurona.

En cuanto a la liberación de beta amilasa en el endospermo almidonado, se sabe que también depende de AG3. aunque en forma indirecta, pues la hormona debe estimular previamente la síntesis de novo de proteasas.

3.- Fitohormonas.

La regulación del metabolismo en las plantas puede clasificarse en dos grandes grupos:

1.- Regulación por factores externos:

Humedad, temperatura, gases, PH, luz.

2.- Regulación por factores internos:

A.- Regulación intracelular.

Regulación de la actividad de los genes.

Regulación de la actividad enzimática.

B.- Regulación intercelular: Fitohormonas.

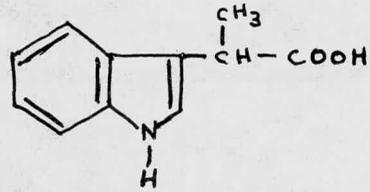
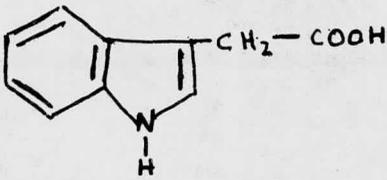
Las fitohormonas juegan un papel muy importante en la regulación de todos los procesos del desarrollo de una planta. Están involucradas en el crecimiento y la diferenciación así como en la latencia, la germinación, la floración, la aparición de los frutos, la embriogénesis, la abscisión, la senescencia, etc.

Se les ha clasificado como reguladores intercelulares, pues son capaces de difundir de célula a célula, o bien de ser transportadas por el sistema vascular y así ejercen su acción en diferentes órganos de la planta.

Las hormonas vegetales se dividen en cuatro grupos principales.

1.- Auxinas:

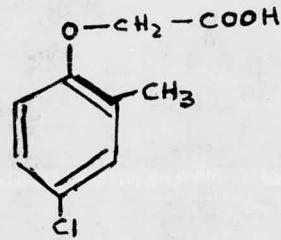
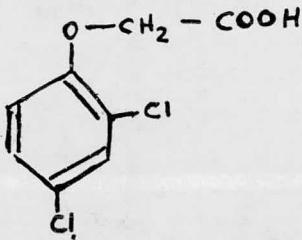
Ejemplos:



Acido indol -3- acético .

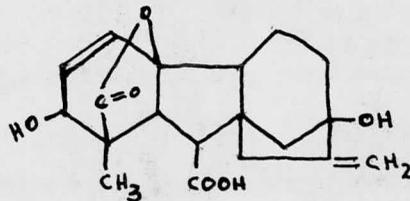
(AIA)

Acido alfa indol -3 propiónico

Acido 2,4- dicloro-
fenoxiacético (2,4-D)Acido 1-cloro -2- metilifeno-
xiacético (AMCP)

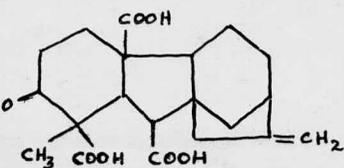
2.- Giberelinas.

Ejemplos:

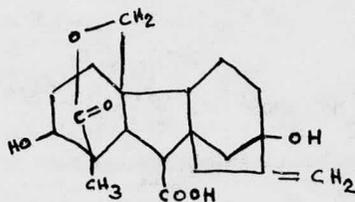


Acido Giberélico

(AG₃)



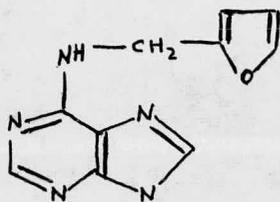
(AG13)



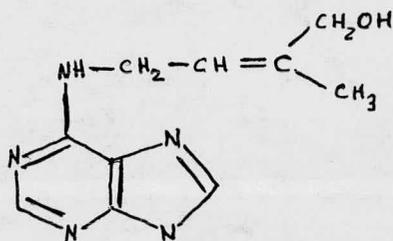
(AG38)

3.- Citocininas

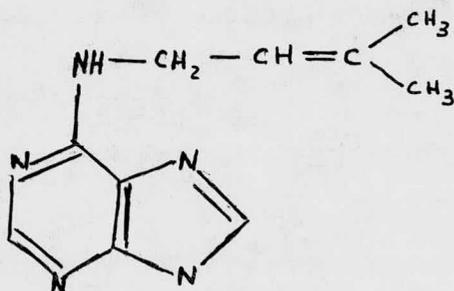
Ejemplos:



6-Furfurilaminopirina
(Cinetina)



Zeatina

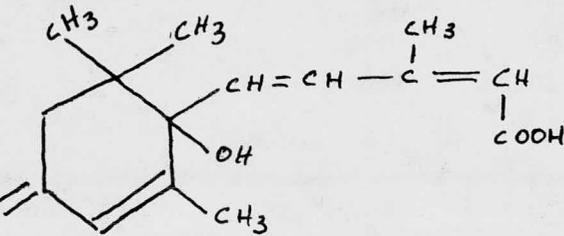


6-Isopentenil adenosina

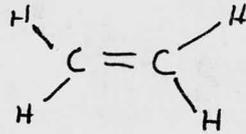
(IPA)

4.- "Inhibidores de Crecimiento".

a.- Acido Abscísico



b.- Etileno



La gran mayoría de los procesos de las plantas no dependen de la acción regulatoria de una sola hormona, sino que generalmente son varias las hormonas que interaccionan para dirigir esos eventos metabólicos. Puede haber interacciones sinérgicas o antagónicas entre las diferentes hormonas, y por lo tanto, son los niveles hormonales endógenos los que en un momento dado tendrán una influencia determinante en el desarrollo global de cada tejido u órgano de la planta.

4.- Efectos del Acido Giberélico y otras fitohormonas en el metabolismo de la germinación.

Durante los últimos quince años se ha dado un gran impulso al estudio del papel que juegan las hormonas vegetales en la germinación, porque se ha visto, que son capaces de regular una gran cantidad de procesos durante esa importante etapa -- del desarrollo vegetal.

a.- Acido Giberélico.

Fué descubierto por Kurosawa en 1920, cuando estudiaba una enfermedad del arroz que consiste en el exesivo crecimiento de las plantas y que es causada por el hongo Gibberella - fujiuroi. En 1939, este investigador cristalizó de un cultivo del hongo una sustancia que era capaz de producir la enfermedad, y le llamó Giberelina. No fué sino hasta 1954, que se dilucidó su estructura química y se le dió el nombre de Acido Giberélico. A partir de entonces se han idetificado más de -- cuarenta análogos del Acido Giberélico que se conocen como -- Giberelinas, y que en mayor o menor grado son funcionalmente-activas.

En general las giberelinas promueven la elongación y la división celular, estimulan consecuentemente el crecimiento de las plantas y son capaces de romper el estado latente de muchas semillas.

Kirshop (1958) reportó por primera vez que el embrión de los cereales produce una sustancia que promueve la hidrólisis de almidón en el endospermo almidonoso. En 1960, Yomo y Paleg descubrieron que se trataba del Acido Giberélico.

Con este descubrimiento se inició una etapa de intensa investigación en el metabolismo de la germinación de los cereales. Se observó que si a las semillas se les quitaba el embrión, podían responder al AG3 exógeno de la misma manera que respondían al que sintetiza el embrión.

Al igual que la semilla completa, estos "endospermos" (semillas sin embrión), responden al AG3 hidrolizando el almidón y las proteínas de reserva, formando azúcares reductores, aminoácidos libres y fosfato inorgánico.

En 1965 Varner observó que el AG3 controla la síntesis de alfa-amilasa en la capa de aleurona y demostró que ésta depende - - - - -

de la síntesis de novo de ARNm. Pollard (1971) sugirió que actúa por mediación de AMPc y Bachorfen dió soporte a esta hipótesis al demostrar en 1973, que la distribución de este mediador de la acción hormonal en las plántulas de Maíz, es muy parecida a la que tienen las auxinas y las giberelinas.

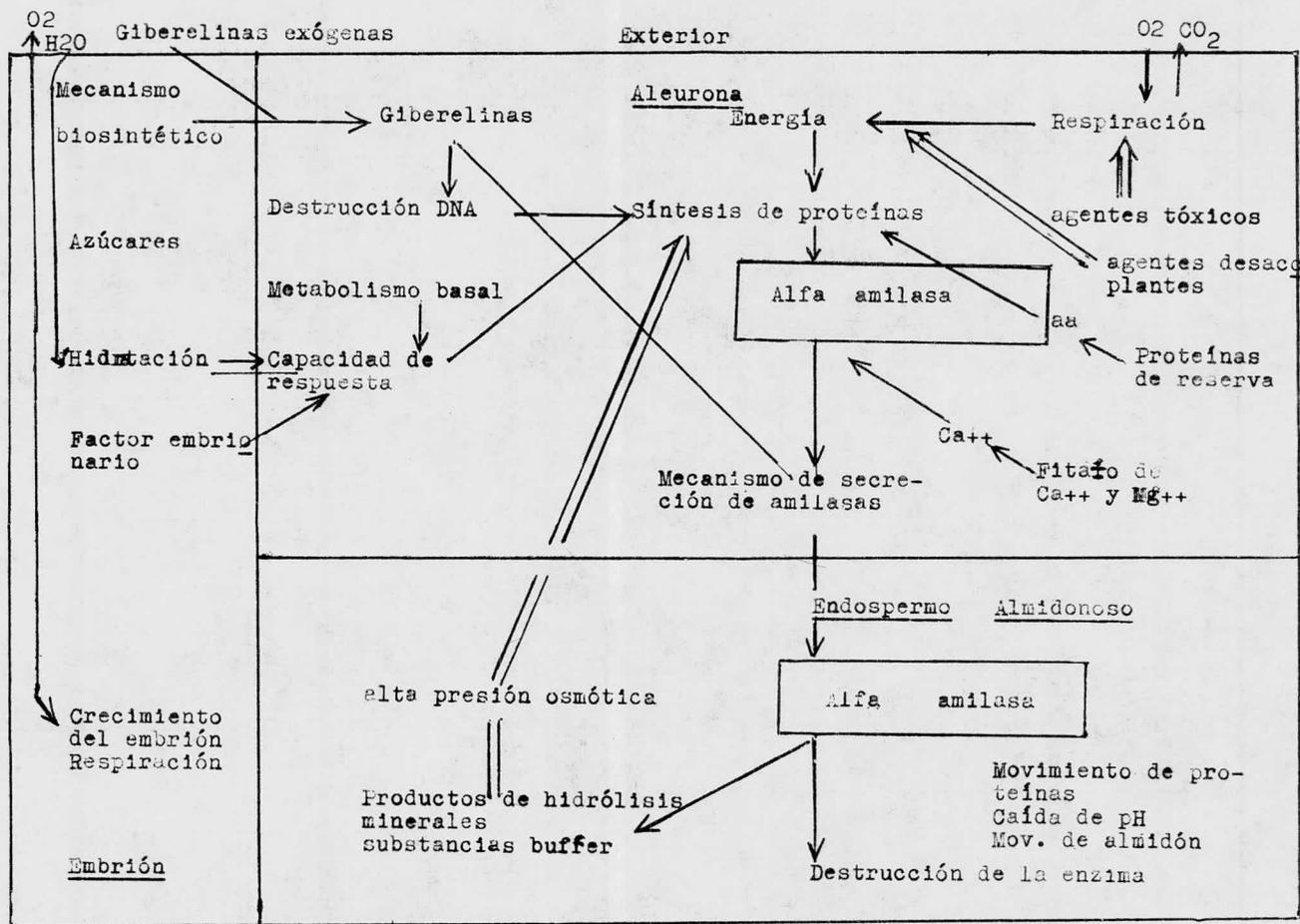
En la figura 4 se muestran los posibles factores involucrados en la regulación de los niveles de alfa amilasa durante la germinación de los cereales.

En 1969 Pollard hizo un estudio de los efectos del AG3 en un buen número de enzimas de cebada y trigo: La primera enzima que fué afectada es la beta -1,3- glucanasa, posteriormente la fosfomonoesterasa, la ATPasa y la fosfatasa. Todas ellas precedían al incremento de alfa amilasa y de proteasas. También se sabe que en las primeras horas de la germinación el AG3 ejerce su primera acción en el embrión promoviendo la síntesis de proteínas y de ARN.

Las técnicas de microscopía electrónica han sido una herramienta muy utilizada durante la última década. Mediante esta técnica, Jones (1969) encontró que el AG3 tiene un papel importante en la distribución y formación de Retículo Endoplásmico rugoso -

Figura 4 (Briggs, 1973)

significa inhibición



y muy probablemente en la formación de polisomas, asimismo las técnicas de radioactividad han contribuído a demostrar que la translocación de glucosa hacia el embrión, es promovida por el Acido Giberélico.

En 1976 Kauffman demostró que el AG3 regula el metabolismo de la pared celular de los vegetales, y Obata concluyó categóricamente que es capaz de inducir la actividad enzimática y la secreción de amilasas preexistentes en capas de aleurona de cebada.

Algunos estudios fisicoquímicos han permitido observar que el choque osmótico inhibe la síntesis de alfa amilasa inducida por AG3 y se sugiere que este puede ser un mecanismo de control de la síntesis de hidrolasas in vivo.

(Jones 1971).

Finalmente, numerosos investigadores reportan que el Acido Abscísico puede revertir los efectos del AG3 y se sabe que no se trata de una inhibición competitiva pero el mecanismo de este efecto se desconoce.

8.- Citocininas.

Durante los primeros estadios de la germinación las citocininas inactivas, sufren interconversiones a formas activas- (Van Staden, 1973). Una vez liberadas, las citocininas secre- tadas por endospermos de trigo, reducen la secreción de iones de la aleurona y de alguna manera afectan el metabolismo de - triglicéridos. (Laidman 1971).

Tzon (1973), utilizando Zeatina marcada con carbono ca-- torce observó que se acumula en el embrión durante la germinación y después se metaboliza rápidamente a polifostados de ri bosilo. Lo más interesante de estos experimentos es que se llugaron a cabo con semillas latentes y no latentes, y que -- los procesos metabólicos no fueron inhibidos por ABA.

Se conocen efectos de las citocininas en el metabolismo- de ARN en la planta adulta, pero permanecen oscuros sus mecanismos y sitios de acción durante la germinación.

Sin embargo, aunque no ha sido comprobado experimental-- mente, no existe alguna razón para negar que su acción en es- te proceso sea diferente a la que tienen en otros estadios - del desarrollo de la planta, en los cuales estimulan la disi- sión celular y retardan la senescencia, encontrándose presen- tes en el anticodón de algunos ARNt por lo que se supone que

actúan a nivel de traducción durante la síntesis de proteínas.

En 1969, Eastwood encontró que inducen la producción de alfa amilasa durante las primeras veinticuatro horas de germinación.

c.- Auxinas.

Se han estudiado muy poco sus efectos durante la germinación.

MeLeod observó que en semillas de trigo hay algunos efectos en que el Acido Indol Acético y el AG3 son sinérgicos.

En 1967 Millar reportó que el AIA es necesario para el desarrollo del sistema vascular del escotelo, que es por donde se transportan las giberelinas desde el embrión hasta el endospermo, para difundir posteriormente a la capa de aleurona.

d.- Acido Abscísico.

El ABA es un antagonista de las hormonas de crecimiento y sus efectos más conocidos en la planta adulta son inducir la senescencia y promover la abscisión de las hojas.

Induce latencia en semillas de diferentes géneros y -- para que su efecto persista, hay que mantener un nivel continuo de la hormona. (Milborrem 1970).

Se sabe que interactúa con otros reguladores del crecimiento, particularmente con AG3 y citocininas. Sin embargo su efecto metabólico permanece obscuro.

Es capaz de prevenir la traducción de ARNm (Ihle 1972) y este puede ser un mecanismo mediante el cual desarrolla sus efectos.

En semillas de cereales puede revertir la inducción de hidrolasas debida al AG3, y el etileno es capaz de antagonizar este efecto del ABA.

Sin embargo, estas observaciones no pueden explicar la inducción de la latencia. Es probable que al igual que otros reguladores del crecimiento, el ABA tenga más de un tejido como blanco y que la latencia sea el resultado de un conjunto de respuestas en diferentes tejidos.

Se puede concluir que las fitohormonas son moléculas capaces de regular la germinación como un todo. Se conocen algunos de sus efectos, pero casi ninguno de sus mecanismos de acción.

III.- Materiales.

1.- Aparatos.

Incubadora Labe Line 0474
 Homogeneizador Politron PCV-2
 Campana estéril Clean Bench Hitachi.
 Centrífuga Beckman J-21
 Centrífuga MSE, LR-6
 Potenciómetro Metrahm E-300
 Colorímetro Bausch and Lomb, Spectronic 20.
 Espectrofotómetro Unicam Spl800 Ultraviolet
 Espectrofotómetro Carl Zeiss PMQII 46275
 Balanza analítica Metler H6 178489
 Calentador y agitador Thermolyne 1000

2.- Reactivos.

Almidón soluble	Merck	1252
Acido Clorhídrico	Baker	952
Acido Succínico	Fulka	14080
Bicarbonato de sodio	Merk	6323
Carbonato de sodio	Merk	206392
Cloruro de calcio	Merk	2382
Cloruro de sodio	Merk	106404
Maltosa	Merk	5912
Molibdato de amonio	Merk	101182
Sulfato de cobre	Baker	1843

Sulfato de sodio	Merck 6649
Tartrato de sodio y potasio	Merck 8087
Yodo resublimado	Merck 4761
Yoduro de potasio	T. Quím. 2530
Agrolita	Dicalite de Méx. S.A.
Cloralez	Alen S.A.

3.- Semillas de Maíz seleccionadas.

Nombre común	Clasificación
Apachito	Ch-71 1751 # Chih. 177
Bofo	IG-73 A286 # Dgo. 93
Chapalote	Ig-71 T440 # Sin. 2
Cristalino de Chihuahua	CH-71 1930 # Chih. 216
Dulce de Jalisco	CP 1971 Jal. 78
Elote cónico	CH-73 461 # Tlax. 251
Gordo	CH-71 1741 # Chih. 146
H - 28	H - 28
Opaco - 2	B-74R Sint. Bajío G02
Palomero de Toluca	C.P. 1971 Méx. 5

Estas semillas se eligieron porque son utilizadas por los agricultores de importantes Zonas de cultivo en México. Cada una de ellas presenta características genéticas propias, y por lo tanto, sus fenotipos son muy diferentes. El estado de la República Mexicana de donde provienen, aparece abreviado en la clasificación.

IV.- Métodos y Resultados.

1.- Determinación cualitativa del efecto del AG3 sobre la actividad amilolítica de las diferentes semillas de Maíz.

a.- Disección de las semillas.

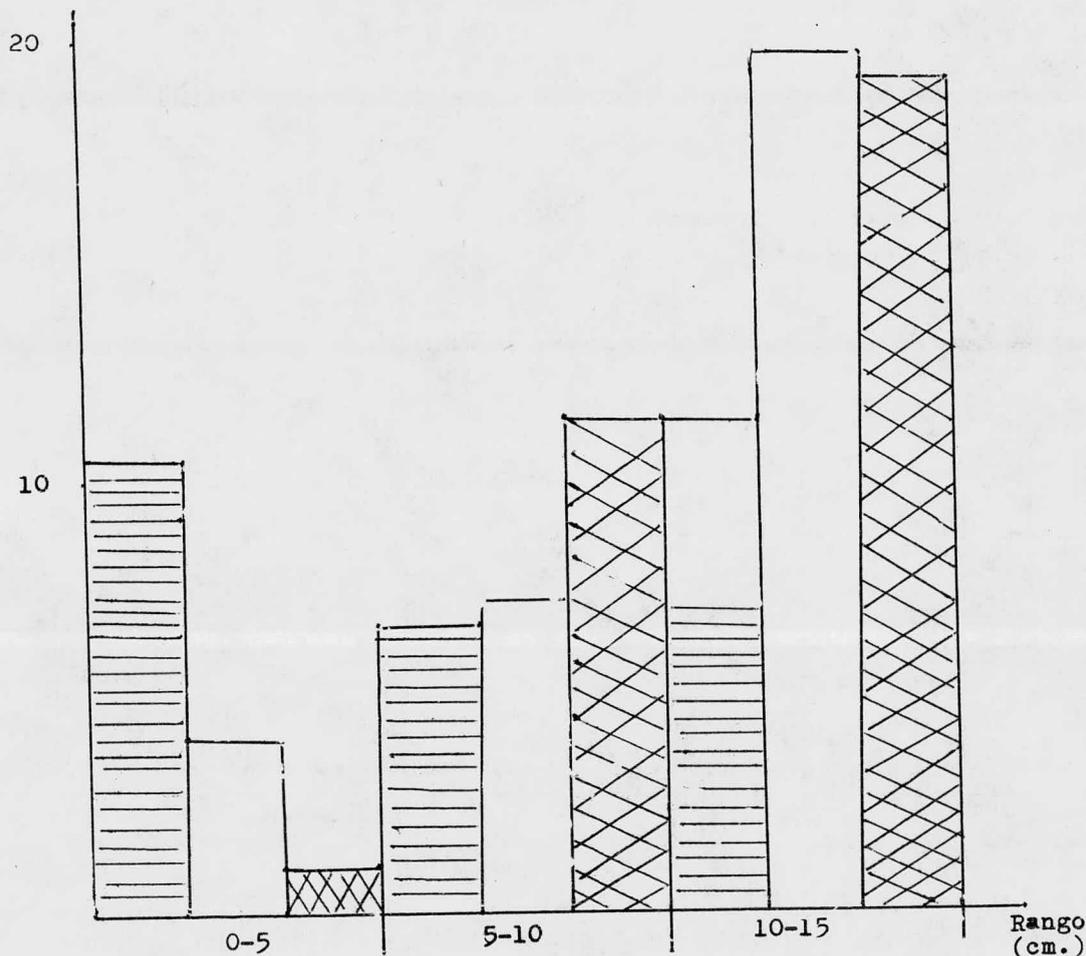
Utilizando un bisturí se hizo un corte transversal que las dividiera en dos partes. La mitad que corresponde a la parte superior de la semilla es la que se utilizó para estos ensayos.

b.- Método de esterilización.

Se probaron los dos métodos de esterilización más recomendados en la literatura, con el objeto de utilizar el más adecuado para este caso.

Fueron tratados lotes de 30 semillas cada uno, y posteriormente se pusieron a germinar en un medio inerte de Agrolita y agua. Al cabo de doce días se midió el tamaño de las pequeñas plantas y así se pudo apreciar la medida en que el método de esterilización afectó su crecimiento. Se utilizó un lote sin tratamiento para poder establecer comparaciones:

Núm. de plantas



Gráfica que presenta dos diferentes métodos de esterilización ensayados en lotes de treinta semillas cada uno.

- 1.-
-  cinco minutos en hipoclorito de calcio al 2%, con vacío
 -  veinte minutos en hipoclorito de calcio al 2%, sin vacío
 -  control sin tratamiento

Se decidió utilizar el método núm. 2 porque es el que aparentemente causa menos daños a la semilla. Ambos proporcionan buena esterilización, y con la ayuda de antibióticos se elimina el riesgo de contaminación bacteriana.

c.- Preparación de los geles de agar- almidón.

Los geles de agar-almidón se preparan disolviendo agar al 1% y almidón soluble (2 mg/ml), en solución amortiguadora de succinato 0.02 M, 20 mM CaCl₂ y pH 5. Para ver el efecto del AG₃ se agregó la hormona de tal manera que su concentración fuese de 1 μ M.

La solución anterior se hierve y se llenan cajas de peti de 5 cm con 10 ml de ella, manteniéndose sin movimiento y en posición horizontal hasta que haya solidificado.

d.- Incubación de las semillas.

Las mitades de semilla sin embrión, previamente esterilizadas y enjuagadas con agua estéril, se colocaron sobre el gel de agar-almidón, poniendo la superficie plana en contacto con el gel y -- presionando ligeramente con la mano. Se pusieron como máximo -- cuatro mitades por caja, y se llevaron a incubar a 25oC en oscuridad total.

El control de temperatura y luz es muy importante, pues cuando se hicieron algunos experimentos en las condiciones del laboratorio, la reproducibilidad de los resultados no fué muy buena.

El tiempo de incubación fué de 48H y se hicieron controles de esterilidad lavando con agua estéril las cuatro mitades de semilla que habían sido incubadas, y una alícuota del agua de lavado se sembró por picadura y por estría en medios nutritivos de gelosa-sangre y Saboureaud, con el objeto de detectar posible contaminación bacteriana o fúngica. Si después de 24 horas a 37oC, en el caso del medio gelosa-sangre, y de cinco días a 28oC, en el caso de Saboureaud, no aparecía crecimiento microbiano, los resultados obtenidos con las semillas a las que pertenecía la alícuota sembrada, se consideraban confiables; en caso contrario los resultados se desechaban porque se supone que una contaminación microbiana puede alterar los resultados, pues hay bacterias y hongos que producen amilasas, a parte de que pueden causar alteraciones-

a los tejidos de la semilla. *

* Todos los experimentos que se describirán posteriormente, llevan los controles de esterilidad que se han descrito.

e.- Difusión de las amilasas.

Durante la incubación, las mitades de semillas se hidratan y se disparan numerosos eventos metabólicos, entre ellos, la sín--tesis y secreción de amilasas.

Estas enzimas son secretadas por la capa de aleurona hacia - el endospermo almidonoso y como éste está en contacto directo con el gel de agar-almidón, las amilasas difundirán también hacia el gel.

La velocidad de difusión depende del tamaño y forma de las - moléculas y de la resistencia a la fricción ofrecida por el gel, así como de la concentración de este soporte.

En las cajas en que los geles contenían AG3, se pudo obser--var una zona de difusión mayor en las semillas sensibles a la --hormona, puesto que en ellas el AG3 induce síntesis de novo y secreción de alfa amilasa.

e.- Revelado de los geles.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se retiraron - las mitades de semilla, y se agregaron a cada caja, 10 ml de una solución de lugol. Inmediatamente apareció una coloración - - azul, al formarse un complejo entre el almidón del gel y el yodo del lugol. En las zonas donde hubo difusión de amilasas se formaron regiones translúcidas de forma circular, debido a que el almidón había sido hidrolizado.

f.- Interpretación de los resultados.

El tamaño de las zonas translúcidas es directamente proporcional a la cantidad de amilasas que difundieron en el gel y que por lo tanto, fueron secretadas por la semilla.

Puesto que las diferentes semillas tuvieron diferente actividad amilolítica como respuesta hacia la hormona, se midió el diámetro de cada una de las zonas translúcidas que fueron producidas y se expresaron los resultados en base a estas medidas:

Si el diámetro de la zona translúcida fué de cero a 0.5 cm, el valor se consideró (-).

Si el diámetro de la zona translúcida fué de 0.5 a 1.0 cm, el valor se consideró (+).

Si el diámetro de la zona translúcida fué de 1.0 a 1.5 cm, el valor se consideró (++).

Si el diámetro de la zona translúcida fué mayor de 1.5 cm, el valor se consideró (+++).

g.- Resultados obtenidos.

Resúmen de los diferentes pasos que se siguieron en la determinación cualitativa.

1.-



Semilla de Maíz.

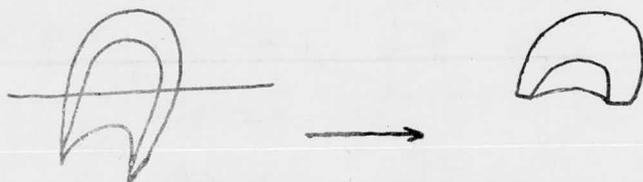
2.-



Se quitó el embrión con un bisturí.

3.-

Se hizo un corte transversal y se utilizó la mitad superior.

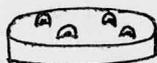


4.-



Se esterilizaron las mitades de semilla sin embrión en hipoclorito de sodio al 2% durante 20 minutos, con agitación.

5.-

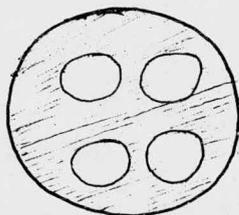


Se colocaron cuatro mitades sobre el gel de agar-almidón.

Los pasos cuatro y cinco se realizaron dentro de una campana estéril de flujo laminar.

6.- Todas las cajas se incubaron durante 48 horas a 25°C, en la oscuridad.

7.-



Se retiran las semillas de las cajas y se revelan los geles con una solución de lugol.

Zonas translúcidas donde las amilasas que difundieron, hidrolizaron el almidón de los geles.

8.- Se midió el diámetro de las zonas translúcidas y se obtuvieron los siguientes resultados.*

Semilla de Maíz	Actividade amilolítica	Actividad amilolítica en presencia de AG3	Sensibilidad a AG3
Bofa	+	+, ++	±
Palomero de Toluca	++	++,+++	±
Apachito	+	+, ++	±
istalino de Chihuahua	++	++	-
H - 28	+	+++	++
Opaco - 2	+	+	-
Elote Cónico	++	+++	-
Chapalote	+	+	-
Dulce	++	++	-
Gordo	+	+	-

*Los resultados que se anotan son una conclusión de un total de 12 experimentos.

Como se puede apreciar, existen dos diferentes variedades capaces de responder al AG3. Cuatro diferentes razas no presentan respuesta, y hay tres casos en los que a pesar del alto número de semillas probadas, no se pudo comprobar si son sensibles a la hormona; es decir, que el hecho de que se anoten como (+), no quiere decir que tienen respuesta media, sino que el $50 \pm 10\%$ de los casos respondió al AG3 en tanto que otro $50 \pm 10\%$ no respondió.

Con los resultados obtenidos se demuestra que la respuesta hacia el AG3 no es una regla general para todas las semillas de Maíz y que depende de la raza o variedad que se elija como modelo.

2.- Determinación cualitativa del efecto del AG3 sobre la actividad amilolítica de diferentes tejidos de Maíz H-28.

Se estudiaron los diferentes tejidos de Maíz H-28 con el objeto de determinar cual de ellos es el responsable de la actividad amilolítica.

a).- Procedimiento.

Después de esterilizar y enjuagar las semillas, se separaron los tejidos: aleurona, endospermo almidonoso, pericarpio y embrión-escotelo. La disección se realizó con un bisturí procurando no dañar a los tejidos. Una vez separados, se analizó cualitativamente su actividad amilolítica según el método descrito en la pág.

b).- Resultados obtenidos.

Tejido	Actividad amilolítica	Actividad amilolítica en presencia a AG3	Respuesta al AG3
Aleurona	+	++	+
Embrión-escotelo	-	-	-
Endospermo almidonoso	+	+	-
Pericarpio	-	-	-
Endospermo almidonoso -			
Aleurona	+	++	+

Nota: En cada caso se realizaron diez experimentos con cuatro muestras cada uno.

*De las aleuronas que se probaron solo un 10% se pudieron mantener vivas y son las que se tomaron en cuenta para los resultados que se presentan.

Puede apreciarse que la actividad amilolítica y la sensibilidad hacia el AG3 radican en la capa de aleurona. Esta es una respuesta que el Maíz H-28 presenta en común con otros cereales como cebada, trigo y centeno.

El hecho de que el endospermo almidonoso tenga cierta actividad, puede ser debido a la existencia de beta amilasas preformadas en este tejido. Al prolongar el tiempo de incubación se observó que a las 96 horas desapareció completamente la actividad amilolítica, lo cual indica que en él no se sintetizan las amilasas. Siempre existió el inconveniente de que es muy difícil mantener vivas a las capas de aleurona al separarlas del pericarpio y del endospermo almidonoso, ya que al perder la protección que estos tejidos les brindaban, murieron en pocas horas y solo un 10% de ellas sobrevivieron más de 40 horas y pudieron ser ensayadas. Sin embargo, cualquier posible duda se eliminó al hacer las mediciones de los experimentos con endospermo almidonoso-aleurona, puesto que, se observó que el 97% de los resultados correspondían a los obtenidos con el 10% de aleuronas, lo cual es suficiente evidencia de que son ellas las responsables de la síntesis y secreción de amilasas, así como de la respuesta al AG3.

3.- Estudio de la respiración de capas de aleurona de Maíz H-28.

Fué necesario realizar un experimento que revelara la viabilidad de las aleuronas:

Las aleuronas que se aislaron de semillas en incubación, sobrevivieron en óptimas condiciones en un 95%, (curva 1). De las que se aislaron antes de ser incubadas solo sobrevivieron entre 8 y 10 %, - (curva 2); el otro 80% murió antes del primer día, (curva 3).

Para el control se utilizaron aleuronas de semillas en germinación.

Estas gráficas demuestran que los resultados obtenidos en los estudios cualitativos son confiables, puesto que las aleuronas de las mitades ensayadas presentan una curva de respiración muy similar a la que presentan las aleuronas de semillas completas de germinación.

En el caso de las aleuronas que fueron incubadas sin la protección del endospermo almidonoso y del pericarpio, y debido a la dificultad para mantenerlas vivas, los resultados que se obtienen solo son demostrativos de que este tejido es el responsable de la actividad amilolítica, pero de ninguna manera podrán hacerse interpretaciones de carácter cuantitativo.

4.- Selección de las tres diferentes razas de Maíz que se utilizaron en los estudios cuantitativos.

De los resultados que se presentan en la pág. se llega a la conclusión de que las semillas de Maíz estudiadas se pueden distribuir en tres grupos:

Semillas Sensibles a AG3	Semillas no sensibles a AG3	Semillas parcialmen <u>t</u> te sensibles a AG3
H-28	Opaco - 2	Apachito
Elote cónico	Dulce	Palomero de Toluca
	Gordo	Bofo
	Chapalote	
	Cristalino de	
	Chihuahua	

Para los estudios cuantitativos se eligió, por su importancia, un tipo de semilla representativo de cada grupo:

- a).- Maíz H-28. Es una variedad que se desarrolló en el Colegio de Post-graduados de Chapingo y que aún no ha sido suficientemente estudiada desde el punto de vista bioquímico. Es un híbrido del Maíz enano, que tiene la cualidad de retardar su crecie

miento en épocas de sequía y así puede economizar agua.

b).- Maíz Opaco - 2. Se ha difundido en todo el mundo y es una de las semillas más prometedoras en la dieta de los países en desarrollo, pues sus proteínas son de buena calidad alimenticia debido a que contienen cantidades elevadas de lisina y triptofano.

Esta variedad es objeto de numerosos estudios, pues presenta los inconvenientes de ser susceptible a la infestación por insectos y que su harina no tiene la textura óptima para ser amasada.

c).- Maíz Palomero de Toluca. Es una raza utilizada en el Valle de México como alimento para aves de corral y animales de engorda. Morfológicamente es muy diferente de otras semillas, pues se trata de un grano pequeño y puntiforme.

5.- Determinación cuantitativa del efecto del AG3 sobre la actividad amilolítica de las tres diferentes semillas de Maíz seleccionadas.

a).- Disección de las semillas.

A todas las semillas se les quitó el embrión y el escotelo con un bisturí, quedando únicamente el endospermo almidonoso, la aleurona y parte del pericarpio. Es decir, se obtuvieron "endospermos" de Maíz.

b).- Método de esterilización.

Los endospermos se esterilizaron durante veinte minutos en hipoclorito de calcio al 2% y posteriormente se lavaron diez veces con agua estéril. Todo se hizo dentro de una campana estéril de flujo laminar.

c).- Incubación en medio líquido.

Los endospermos esterilizados se transfirieron a cajas de petri estériles de nueve cm de diámetro que contenían un disco de papel - Whatman #3 y diez ml de medio de incubación.

El medio de incubación es un amortiguador de succinato 0.02 M - con 200 μ M de CaCl_2 a pH 4.8. Además contiene 10 μ g/ml de Penicilina, 10 μ g/ml de Cloramfenicol y 25 μ g/ml de Estreptomina.

El amortiguador de succinato se eligió porque en comunicación con el Dr. J. Varner, nos sugirió no utilizar acetato, que es el -- que generalmente se emplea en estos ensayos, porque en algunos estudios que el ha realizado, pudo apreciar que inhibe en cierto grado-

la actividad amilolítica de la semilla.

Algunos investigadores (Harvey, Oaks; 1974) han reportado que el CaCl_2 estabiliza la actividad amilolítica. El pH 4.8 es considerado - óptimo para las amilasas de Maíz y otros cereales (Harvey 1974; Jennings 1975; Varner, 1966). Los antibióticos se utilizaron para inhibir el - crecimiento bacteriano.

Con el fin de comprobar que las concentraciones de antibióticos no afectan la expresión de la actividad amilolítica, se hizo un experimento en el que se ensayó la actividad del Maíz H-28 en tres y cinco días de incubación.

Resultados:

Medios de incubación sin antii
biótico.

. Medio de incubación con antii
biótico.

"endospermos" de Maíz H-28

Tiempo	U de amilasa	Tiempo	U de amilasa
3 días	0.63	3 días	0.62
5 días	1.58	5 días	1.60

Con esto se comprobó que las concentraciones de antibióticos utilizadas, no afectan en forma significativa la expresión de la actividad amilolítica.

Una vez que los "endospermos" se esterilizaron, se transfirieron en grupos de diez a las cajas de petri que contenían el medio líquido, y se anotó el peso seco de cada grupo. Las cajas se cerraron y fueron incubadas a 25°C, en la obscuridad y sin agitación. Se ensayaron tiempos de incubación de cero a cinco días para hacer las determinaciones de actividad amilolítica. Para ver el efecto del AG3, se añadió 1 M de la hormona al medio líquido - de algunas de las cajas, y las que no contenían AG3 se utilizaron como controles.

Se utilizaron los controles de esterilidad descritos en la -- pág. , con la diferencia de que en este caso se aplicaron a los "endospermos" y al medio de incubación.

d).- Extracción enzimática.

Las cajas de petri se retiraron de la incubadora y los "endospermos" que contenían se homogeneizaron con 20 ml de amortiguador de succinato 0.02M, ph 4.8, en un homogeneizador Politrón durante dos minutos a su máxima velocidad. La temperatura nunca excedió de 60°C.

El homogenado se centrifugó a 40. C durante diez minutos y - - 20 000 g. Se colectó el sobredante filtrándolo a través de cuatro ca pas de gasa y se ajustó el volúmen a 20ml, obteniéndose el extracto-enzimático.

e.- Método de Nelsson (30), para determinar la actividad amilolítica.

Consiste en medir los reductores totales que son liberados par la acción de las amilasas. Esto se logra al medir la cantidad de cobre que pueden reducir en un tiempo dado. El cobre reducido se cuantifica haciéndolo reaccionar con una solución de arsenomolibdato de amonio, para formar un complejo colorido.

1.- Preparación de las soluciones para el ensayo:

Solución de subtrato. Se pesa un gramo de almidón soluble y se disuelve en 50 ml de amortiguador succinato 0.02 M, 200mM CaCl₂ y ph 4.8. Se hierve durante un minuto. Se enfría a temperatura ambiente y se centrifuga durante veinte minutos a 2000 g. Esta solución contiene 20 mg/ml de almidón.

Reactivo A. En 800 ml de agua desionizada se disuelven 25g de - carbonato de sodio anhidro, 25g de tartrato de sodio y potasio, 20g- de bicarbonato de sodio y 200 g de sulfato de sodio anhidro. Se afora a un litro y se filtra la solución.

Reactivo B. En 200 ml de agua desionizada que contenga cuatro gotas de H_2SO_4 concentrado se disuelven 30g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$.

Reactivo C. En 450 ml de agua desionizada que contenga 21 ml de H_2SO_4 concentrado, se disuelven 25g de molibdato de amonio. En otro recipiente se disuelven 3 g de arsenato de sodio heptahidratado en 25 ml de agua. Esta solución se agrega lentamente a la anterior, con agitación constante. La mezcla se afora a 500 ml, se agita y se calienta durante 30 minutos a $55^\circ C$.

Reactivo D. Un ml de reactivo B se agrega a 24 ml del reactivo A.

2.- Procedimiento:

Un mililitro del extracto enzimático diluido según convenga, se agrega a un ml de solución de sustrato. Después de 10 minutos de incubación a $25^\circ C$, se agrega un ml del reactivo D recién preparado, a una porción del digerido (mezcla de reacción) entre 1.0 y 0.5 ml. El volumen se completa a 2 ml con agua desionizada. La solución se coloca en un baño de agua en ebullición durante veinte minutos y -- después se enfría en agua corriente durante 5 minutos. Se agrega un ml de reactivo C y la mezcla se agita hasta que deja de producirse CO_2 . La solución se deja reposar 10 minutos y se diluye a 25 ml --

con agua desionizada. La absorbancia de la solución se lee contra un blanco de reactivos a 520 nm en un espectrofotómetro.

Cálculo de las unidades de amilasa.

Se preparó una curva patrón de maltosa, para poder expresar -- los resultados en μg de producto aparecido, y posteriormente en -- unidades de amilasa por gramo de tejido. La cuantificación se hizo por el método de Nelsson.

Resultados.

Solución patrón de maltosa	Absorbancia
$\mu\text{ g/ml}$	520 nm
150	.175
250	.275
350	.375
450	.460

Conociendo la curva patrón se preparaba una dilución del extracto enzimático de tal manera que su actividad nunca fuera mayor de 0.5 unidades de absorbancia, pues este valor es el máximo permitido para que las determinaciones se realicen dentro de las condiciones óptimas del método. Una vez obtenidos los valores -- para cada extracto, se interpolaron en la curva patrón para ver a que cantidades de maltosa correspondían; y se calcularon las unidades de amilasa por g de semilla.

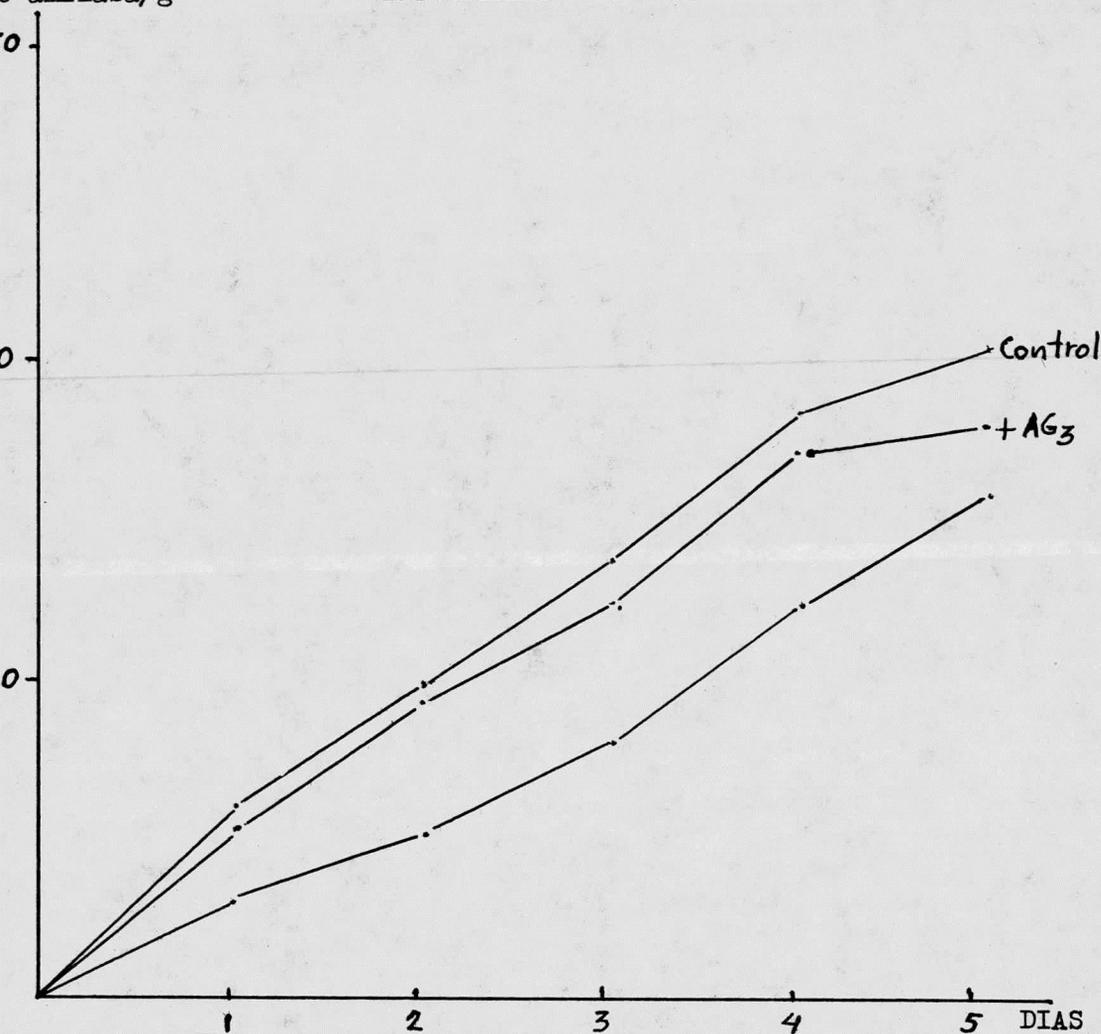
$$\frac{\text{U de amilasa}}{\text{g}} = \frac{(\text{Mg/ml/min}) (\text{Vol. digerido}) (\text{dilución})}{(\text{PM maltosa}) (\text{peso de la muestra en g})}$$

f.- Resultados obtenidos.

Las siguientes gráficas muestran cuantitativamente la actividad amilolítica y la susceptibilidad al AG3 de los "Endospermos" de Maíz, durante cinco días de incubación.

e amilasa/g

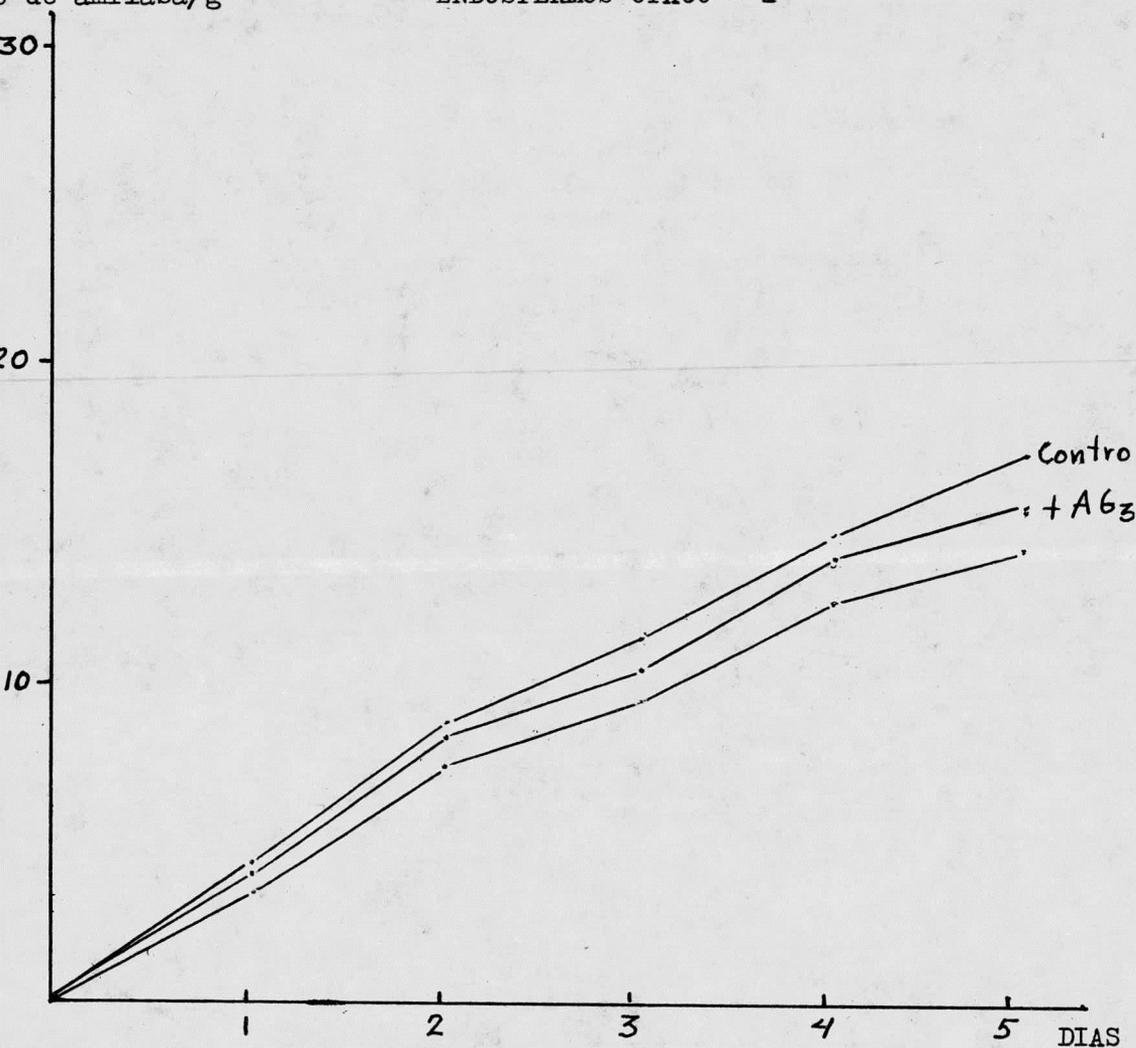
ENDOSPERMOS H - 28



Gráfica que representa la actividad amilolítica de "endospermos" de Maíz H-28 durante cinco días de incubación en medio líquido. El control es la actividad de semillas completas en germinación. Todos los puntos representan el promedio de cinco experimentos.

U de amilasa/g

ENDOSPERMOS OPACO - 2

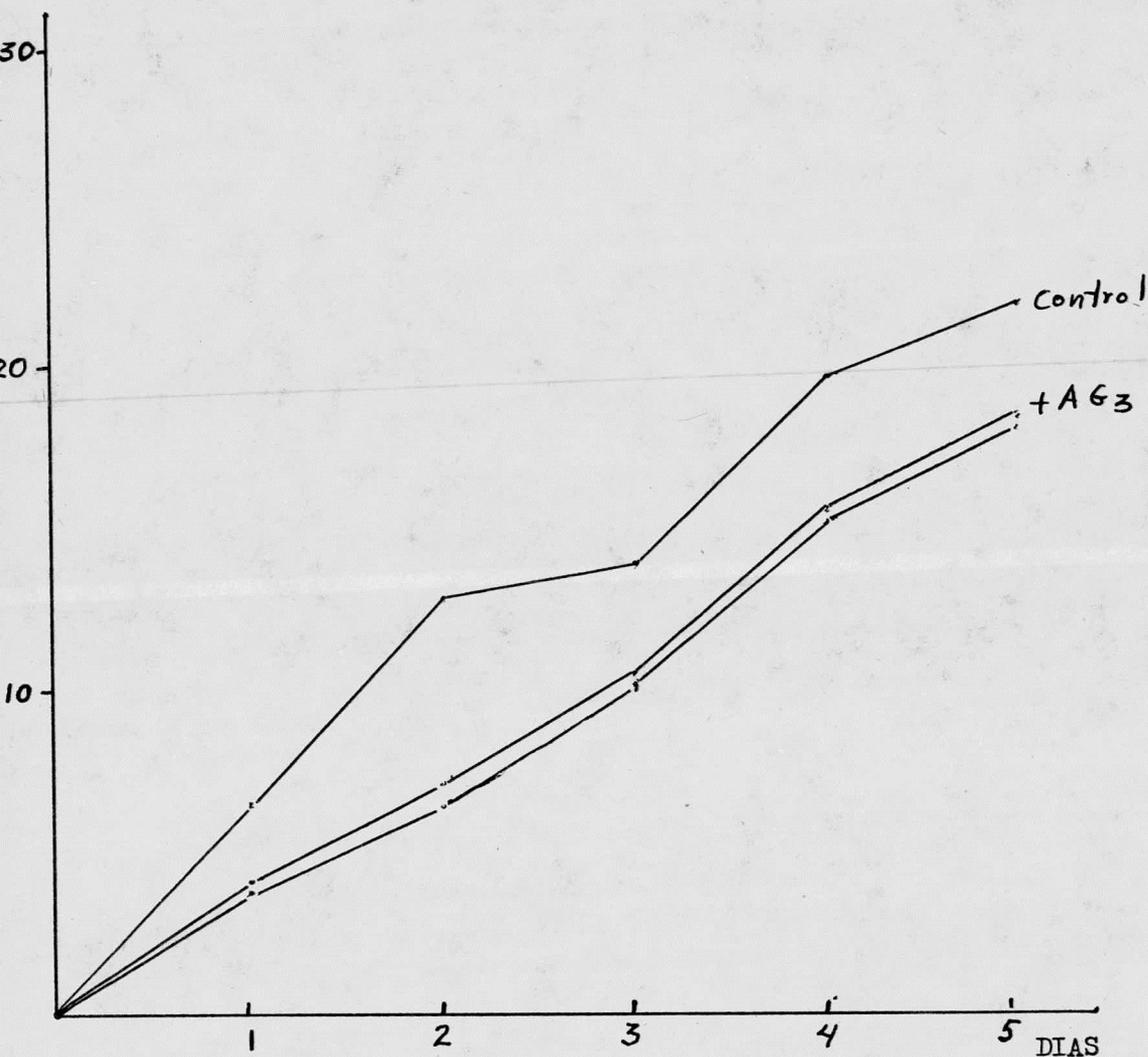


Gráfica de la actividad amilolítica de "endospermos" de Maiz Opaco-2 durante cinco días de incubación en medio líquido. Como control se tomó la actividad de semillas completas en germinación.

Todos los puntos representan el promedio de cinco experimentos.

ENDOSPERMOS PALOMERO

de amilasa/g

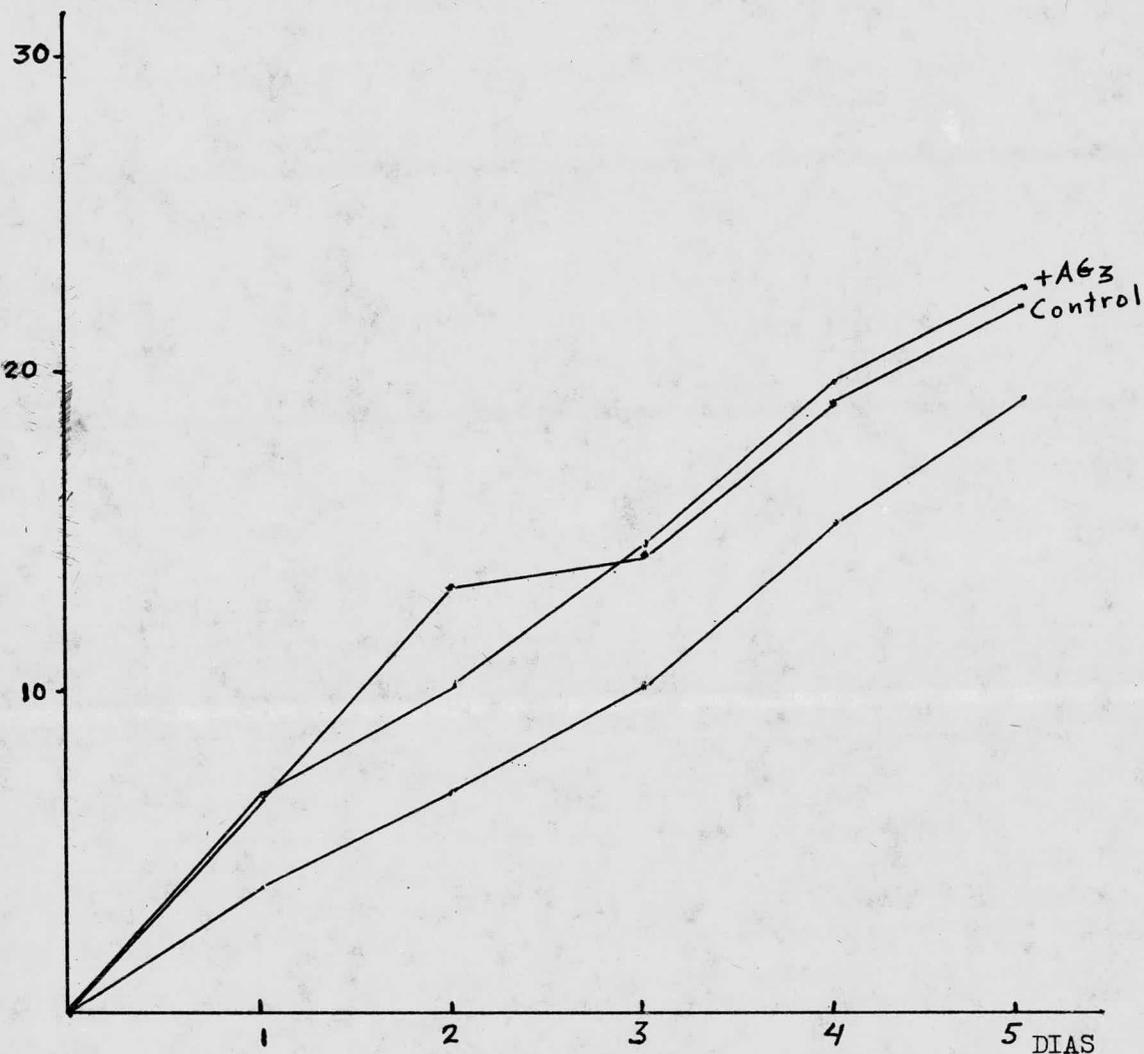


Gráfica de la actividad amilolítica de "endospermos" de Maíz Palomero durante cinco días de incubación en medio líquido. Como control se tomó la actividad de semillas completas en germinación.

Todos los puntos representan el promedio de cinco experimentos.

U de amilasa/g

ENDOSPERMOS PALOMERO



Gráfica de la actividad amilolítica de "endospermos" de Maíz Palomero durante cinco días de incubación en medio líquido. Como control se tomó la actividad de semillas completas en germinación

Todos los puntos representan el promedio de cinco experimentos.

TABLA DE RESULTADOS CUANTITATIVOS.

ENDOSPERMO H-28
(U de amilasa / g)

DIA	- AG ₃	+ AG ₃	CONTROL
1	2.8	5.0	5.5
2	5.2	8.8	9.6
3	8.0	12.4	13.5
4	12.4	17.2	18.5
5	16.0	17.8	20.0

ENDOSPERMO OPACO-2
(U de amilasa / g)

DIA	-AG ₃	+ AG ₃	CONTROL
1	3.4	4.0	4.2
2	7.4	8.6	8.9
3	9.5	10.5	11.8
4	12.8	14.0	15.1
5	14.6	16.2	17.5

ENDOSPERMO PALOMERO
(U de amilasa / g)

DIA	- AG ₃	+ AG ₃	CONTROL
1	4.0	4.2, 7.1	7.0
2	7.1	7.5, 10.3	13.5
3	10.3	10.4, 15.0	14.6
4	15.4	15.8, 19.7	19.1
5	19.0	19.3, 22.8	22.0

ENDOSPERMO OPACO-2
-AG3

DIA	\bar{X}	S	$\bar{X} \pm S$
1	3.44	.093	(3.533, 3.347)
2	7.42	.088	(7.508, 7.332)
3	9.49	.079	(9.569, 9.411)
4	12.81	.121	(12.931, 12.689)
5	14.59	.200	(14.790, 14.390)

+AG3

DIA	\bar{X}	S	$\bar{X} \pm S$
1	4.0	.121	(4.121, 3.879)
2	8.59	.081	(8.671, 8.509)
3	10.55	.152	(10.702, 10.398)
4	14.02	.210	(14.23, 13.81)
5	16.13	.168	

CONTROL.

DIA	\bar{X}	S	$\bar{X} \pm S$
1	4.24	.180	(4.420, 4.060)
2	8.89	.078	(8.968, 8.812)
3	11.80	.111	(11.911, 11.689)
4	14.11	.160	(15.27, 14.95)
5	17.49	.200	(17.69, 17.29)

ENDOSPERMO PALOMERO DE TOLUCA.

DIA	-AG3		
	\bar{X}	S	$\bar{X} - S$
1	4.01	.181	(4.191, 3.829)
2	7.11	.163	(7.273, 6.947)
3	10.29	.141	(10.431, 10.149)
4	15.38	.175	(15.555, 15.205)
5	19.00	.192	(19.192, 18.808)

DIA	+AG3	
	\bar{X}	S
1	4.23, 7.12	.210, .195
2	7.51, 10.35	.202, .210
3	10.42, 15.01	.197, .213
4	15.83, 19.74	.185, .214
5	19.32, 22.84	.201, .199

DIA	CONTROL.		
	\bar{X}	S	$\bar{X} - S$
1	7.00	.082	(7.082, 6.918)
2	13.48	.079	(13.559, 13.401)
3	14.65	.100	(14.750, 14.550)
4	19.14	.103	(19.243, 19.037)
5	22.00	.141	(22.141, 21.859)

ENDOSPERMOS H-28
-AG3

DIA	X	S	$\bar{X} \pm S$
1	2.79	.095	(2.885, 2.695)
2	5.20	.103	(5.303, 5.097)
3	8.04	.109	(8.149, 7.931)
4	12.39	.077	(12.467, 12.313)
5	15.99	.21	(16.200, 15.78)

+AG3

DIA	X	S	$\bar{X} \pm S$
1	5.02	.086	(5.106, 4.934)
2	8.84	.090	(8.930, 8.750)
3	12.37	.125	(12.495, 12.245)
4	17.19	.112	(17.302, 17.078)
5	17.76	.180	(17.940, 17.580)

CONTROL.

DIA	X	S	$\bar{X} \pm S$
1	5.55	.095	(5.645, 5.455)
2	9.56	.121	(9.681, 9.439)
3	13.48	.092	(13.572, 13.388)
4	18.50	.183	(18.683, 18.317)
5	20.01	.201	(20.211, 19.809)

En la gráfica que se obtuvo con Maíz H-28 se puede apreciar que la actividad amilolítica de los "endospermos" de esta variedad es inducida por el AG3 durante cinco días de incubación. En el caso del Maíz Opaco-2 no se encontró alguna inducción significativa. Para el Maíz Palomero de Toluca se presentan tres gráficas que representan los tres diferentes tipos de resultados que se obtuvieron al medir los efectos de la hormona sobre estos --- "endospermos". (como ya se mencionó con esta raza no se pudieron obtener resultados repetitivos en nueve experimentos, por lo que se trató de resumir en esas gráficas las tres diferentes tendencias que se presentaron con más frecuencia).

En todos los casos, los "endospermos" que se incubaron en ausencia de AG3 presentan una curva de actividad que aumenta durante los cinco días de incubación.

Debe notarse que cada semilla tiene un valor característico de actividad amilolítica en cada día, es decir, que los valores de cantidad de amilasa por g de tejido no son comparables entre las diferentes variedades y razas de Maíz.

6.- Determinación de la capacidad de respiración de aleuronas de -
semillas de Maíz H-28 incubadas en medio líquido.

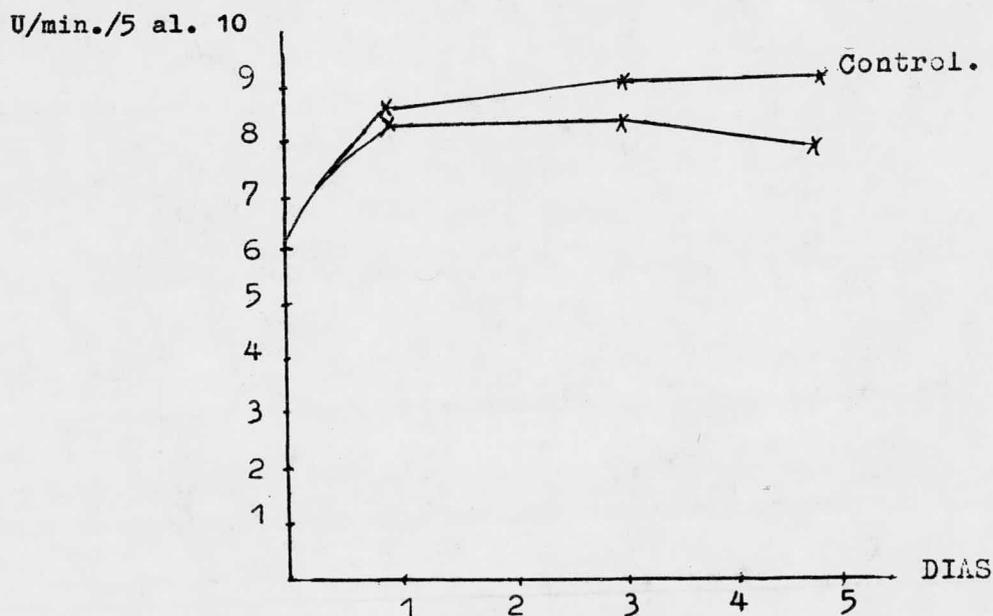
Este experimento se realizó para conocer la viabilidad de los
"endospermos" que fueron incubados de cero a cinco días.

a).- Procedimiento.

Con una pequeña espátula se separó el endospermo almidonoso de
la aleurona y del pericarpio.

Las aleuronas así aisladas, se colocaron en 4 ml de amortigua-
dor de fosfato de potasio pH7, en el compartimiento de ensayo de un
oxímetro, y se determinó el consumo de oxígeno de cinco aleuronas,
durante diez minutos.

b).- Resultados obtenidos.



Se puede apreciar que no existieron diferencias significativas entre la respiración de las aleuronas de "endospermos" en in cubación y las de semillas en germinación. Por lo tanto, los "endospermos" fueron viables durante los cinco días de incubación.

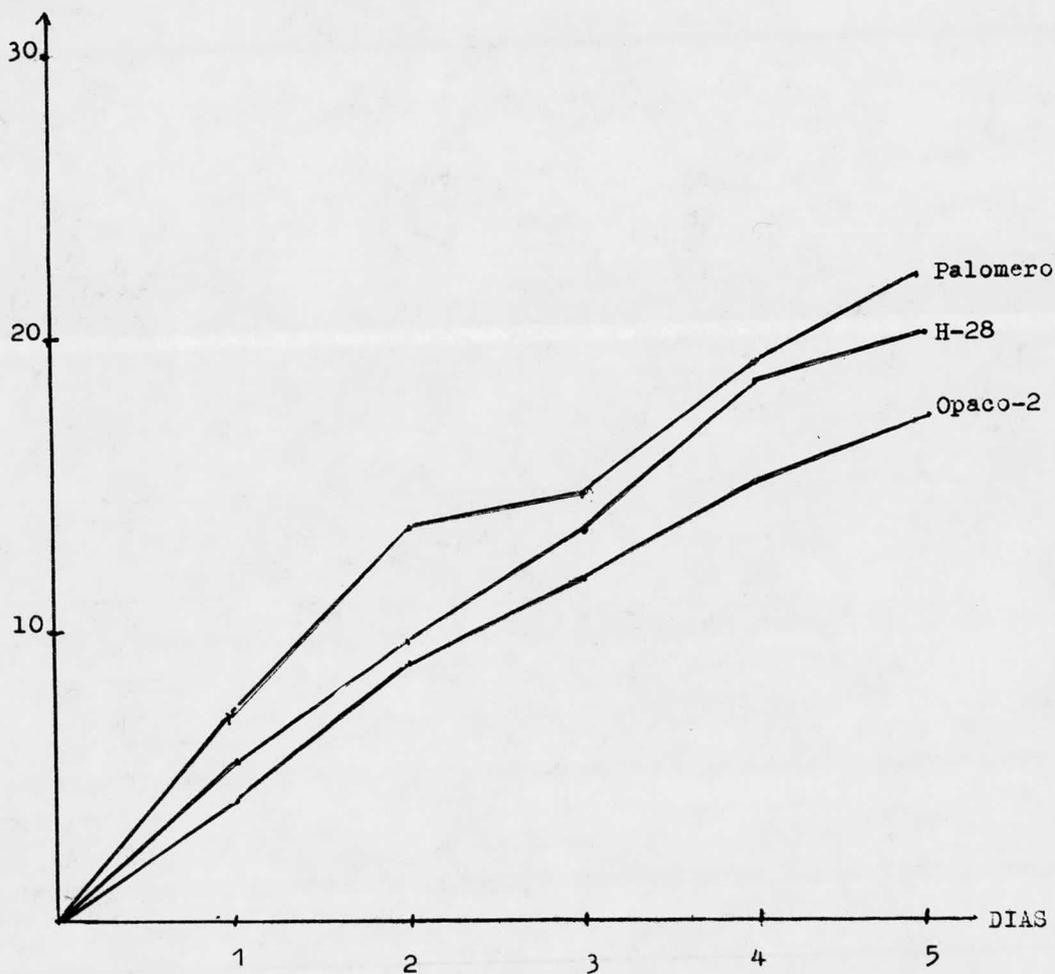
7.- Determinación de la actividad amilolítica de semillas en ger minación.

Este experimento se realizó con el objeto de establecer los debidos controles para los ensayos cuantitativos.

Se midió la actividad de semillas en germinación durante un período de cero a cinco días. Se utilizó el método de Nelsson y los resultados se expresaron en U de amilasa por g de semilla.

DIA	SEMILLAS (U Amilasa)		
	H-28	Opaco - 2	Palomero
1	5.5	4.2	7
2	9.6	8.9	13.5
3	13.5	11.8	14.6
4	18.5	15.1	19.1
5	20	17.5	22

U amilasa



V.- Conclusiones y discusión general.

- 1.- Para esterilizar semillas de Maíz, se puede utilizar hipoclorito de sodio al 2% en agua, durante veinte minutos, sin vacío, obteniéndose buenos resultados.
- 2.- Los experimentos bioquímicos con semillas deben realizarse en condiciones estériles. Es necesario llevar a cabo estrictos controles de contaminación microbiana.
- 3.- El método cualitativo de los geles de agar-almidón es una forma sencilla de detectar la actividad amilolítica de las semillas de Maíz. Se puede aprovechar para obtener una idea de cual puede ser la respuesta hacia alguna hormona, antes de emprender un largo análisis cuantitativo.
- 4.- En el endospermo almidonoso de la semilla sin germinar hay muy pocas amilasas. La actividad amilolítica que se manifiesta durante las primeras horas de incubación se debe a amilasas preformadas durante la embriogénesis.
- 5.- La aleurona es el tejido responsable de la síntesis y secreción de amilasas así como de la respuesta al AG3, en semillas de Maíz H-28.
- 6.- La velocidad de respiración de las capas de aleuronas es un buen índice de la viabilidad de "endospermos" de Maíz.

La protección del pericarpio y del endospermo almidonoso es muy importante para que las aleuronas sobrevivan más de cinco días en incubación y en buenas condiciones. Sin la presencia de estos tejidos solo un 10% de ellas sobrevive más de 48 horas.

- 7.- 10 $\mu\text{g/ml}$ de Penicilina, 10 $\mu\text{g/ml}$ de Cloramfenicol y 25 $\mu\text{g/ml}$ de Estreptomina son concentraciones de antibióticos de gran ayuda para prevenir el crecimiento microbiano en el medio líquido que se utilizó para incubar "endospermos" de Maíz. Estas cantidades no alteran la actividad amilolítica.
- 8.- El AG3 induce un aumento importante en la actividad amilolítica de "endospermos" de Maíz H-28.
- 9.- El AG3 no altera en forma significativa la actividad amilolítica de "endospermos" de Maíz Opaco - 2, durante cinco días de incubación.
- 10.- Los "endospermos" de Maíz Palomero de Toluca presentan una respuesta heterogénea al AG3.
- 11.- Las diferentes razas y variedades de Maíz que fueron estudiadas presentan diferentes respuestas a la inducción amilolítica con AG3.
- 12.- Las tres diferentes razas de Maíz que se analizaron cuantitativamente presentan curvas de actividad que siempre aumenta durante cinco días. Esto significa que en los tres casos el embrión no es indispensable para la síntesis y secreción de enzimas -- amilolíticas.
- 13.- Es probable que el Maíz H-28 sea sensible al AG3 por tener relación genética con el maíz enano, que se ha reportado que tiene pocas giberelinas endógenas para expresar su total actividad amilolítica.

La medida de la velocidad de respiración de las aleuronas de los "endospermos" que se ensayaron fué de gran ayuda para establecer los debidos controles y poder asegurar que el material biológico se encontraba en óptimas condiciones, eliminando posibles errores por alguna disminución en la actividad bioquímica de los tejidos.

En diferentes ocasiones se han publicado resultados que aparentemente no corresponden unos con otros, pues algunos investigadores reportan que el Maíz, al igual que otros cereales, depende del AG3 para expresar su total actividad amilolítica; también hay quienes dicen que ningún factor embrionario es necesario.

Hemos encontrado que depende de cual sea la raza que se elija. Es decir, que la respuesta al AG3 es una característica propia de cada semilla y depende de las cualidades genéticas de la misma. Pero en todos los casos, aún en aquellas semillas sensibles al AG3, se demuestra que la actividad amilolítica puede desarrollarse aún en la completa ausencia del embrión.

Por otra parte, proponemos la hipótesis de que el Maíz H-28 es sensible al AG3 por tener pocas giberelinas endógenas, pues está relacionado con el Maíz enano. Se sabe que éste es deficiente en giberelinas y que en algunos casos el AG3 puede estimular su actividad amilolítica en más de 300%.

Esta hipótesis es un buen ejemplo en el que se correlacionan las características genéticas con las propiedades bioquímicas.

Se pretende en el futuro, que el trabajo interdisciplinario de agrónomos, bioquímicos, fitomejoradores, etc., cristalice en lograr que las diferentes semillas que existen en el país sean ampliamente conocidas en todos sus aspectos para poder distribuir las a las zonas de cultivo con plena conciencia, es decir, poder recomendar la mejor semilla conociendo cual va a ser su rendimiento y comportamiento -- en las condiciones edafológicas y climatológicas de la región en - que se va a sembrar.

VI .- Bibliografia.

- 1.- Alexandrescu V. and Florin M. Rev. roum. Biochim; 10,2,89 (1973)
- 2.- Arias I., Williams P. and Bradbeer J. Planta (Berl.) 131,135 (1976)
- 3.- Bachofen R. Plant Science Letters. 1,447 (1973)
- 4.- Chao and Scandalios. Biochem. Genet. 3,537 (1969)
- 5.- Chen S. and Chang J. Plant Physiol. 49,441 (1972)
- 6.- Chen S. and Park W. Plant Physiol. 52, 174 (1973)
- 7.- Chen S. Planta 95, 336 (1970)
- 8.- Chrispeels M. and Varner J. Plant Physiol. 42, 398 (1967)
- 9.- Chrispeels M. and Varner J. Plant Physiol. 42, 1008 (1967)
- 10.- Doig R., Colborne A., Morris G. and Laidman D. J. of exp. Bot.26,399 (1975)
- 11.- Bure L. Plant Physiol 35, 925 (1960)
- 12.- Filner P. and Varner J. Proc. Nat. Acad. Soc. 58, 1520 (1967)
- 13.- Finnegan. Plant Physiol. 40, 672. (1969)
- 14.- Fleming W. and Howden M. Rev. Pure and Appl. Chem. 22, 67 (1972)
- 15.- Fuchs Y. and Gertman E. Plant and Cell Physiol. 15, 629. (1974)
- 16.- Goldstein L. and Jennings P. Plant Physiol. 55, 893 91975)
- 17.- Harvey B. and Oaks A. Planta (Berl) 121, 67 (1974)
- 18.- Hebard F., Kaufman P. Plant Physiol. 58, 670 (1976)
- 19.- Hess D. "Plant Physiology". Springer-Verlag, Berlin New York-Heidelberg. 1a. Ed. (1975)
- 20.- Ingie J., Hageman R. Plant Physiol.
- 21.- Jacobsen, Scandalios and Varner. Plant Physiol. 42, 1596 (1970)
- 22.- Kadam S., Mehta S. Phytochem. 12, 1221 (1973)

- 23.- Johnson K. and Chrispeels M. *Planta* (Berl.) 111, 353 (1973)
- 24.- Kruger J. *Cereal Chem.* 49, 391 (1972)
- 25.- Labansat E. Facultad de Química UNAM. Tesis Profesional (1975)/
- 26.- Mayer A. and Shein Y. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 167 (1974)
- 27.- Meredith P. and Jenkins L. *Cereal Chem.* 50, 243 (1973)
- 28.- Morita Y., Yamashita H. *J. Biochem.* 79, 591 (1976)
- 29.- Nadeau R. and Rappaport L. *Plant Physiol.* 54, 809 (1974)
- 30.- Nelsson J. *Of Biol. Chem.* 153, 375 (1944)
- 31.- Nummi M., Enari T. *M. J. Sci. Fd. Agric.* 21, May. (1970)
- 32.- Obata T. and Susuki H. *Plant and Cell Physiol.* 17, 63 (1976)
- 33.- Safran M. and Galsky A. *Plant and Cell Physiol.* 15, 527 (1974)
- 34.- Scandalios. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 225 (1974)
- 35.- Tanaka and Akazawa. *Plant Physiol.* 46, 586 (1970)
- 36.- Tuan-Hua H. and Varner J. *Plant Physiol.* 57, 175 (1976)
- 37.- Varner J. *Plant Physiol.* 39, 413 (1965)
- 38.- Verbeek R., Gaspar T. et Khan A. *Soc. Bot. Mémoires*, 141 (1972)
- 39.- Vigil E. and Ruddat M. *Plant Physiol.* 51, 549 (1973)
- 40.- Wareing P. and Phillips I. "The control of growth and differentiation in plants". Pergamon Press, Oxford, New York, 2a. Ed. (1973)
- 41.- Wielgat B., Kleczkowski K. *Acta Bioch. Pol.* 21, No. 1 (1974)
- 42.- Wolf M., Khoo U. *Crop Science.* 12, 440 (1972)
- 43.- Wood A. and Paleg L. *Plant Physiol.* 50, 103 (1972)

**Terminó de imprimirse en
agosto de 1977 en los Ta-
lleres Gráficos de la Edito-
rial del Magisterio "Benito
Juárez".**