

24/03/2010

ND  
PDF

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

" ESTUDIO SOBRE LA REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA DURANTE LAS PRIMERAS HORAS DE GERMINACION EN MAIZ ".

TESIS DE MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS

( BIOQUIMICA )

J . JESUS QUIROZ MORA.

MEXICO, D.F.

1984



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).

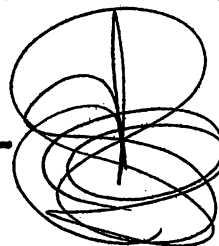
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA VEGETAL  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE QUIMICA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.**

**NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE:**

**J. JESUS QUIROZ MORA**

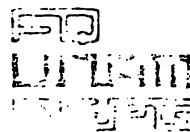
A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a vertical line, positioned to the right of the printed name.

**NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ.**



FACULTAD DE QUIMICA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
SECRETARIA ACADEMICA



SECRETARIA NACIONAL  
ACADEMICA

LICENCIADA MARIA MONTIEL MARQUEZ.  
Unidad de Registro e Información.  
Consejo de Estudios de Posgrado.  
Ciudad Universitaria.  
Presente.

Me es muy grato informar a usted que el alumno JESUS QUIROZ MORA, presentará próximamente su examen para obtener el -- grado de Maestría en Ciencias Químicas(Bioquímica) ante el siguiente jurado.

Presidente.  
1er.vocal.  
Secretario.  
Suplente.  
Suplente.

DRA.MA.LUISA ORTEGA.  
DRA.RUTH ROMAN.  
DR.ALBERTO HAMABATA.  
DRA.IRMA BERNAL.  
DR.MANUEL ROBERT.

Muy Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Ciudad Universitaria D.F. 13 de diciembre de 1982.

EL DIRECTOR

DOCTOR JAVIER PADILLA OLIVARES

c.c.p. Coordinador del Area, Dra.Ruth Román.  
c.c.p. Jefe de la Coordinación Escolar, Q.Jorge Arango.  
c.c.p. Integrantes del Jurado.

JPO/rm.

I N D I C E

R E S U M E N . . . . .	9
I N T R O D U C C I O N . . . . .	12
1.-A N T E C E D E N T E S . . . . .	17
1.1.- Biología de la formación de la semilla	18
1.2.- Acumulación de carbohidratos en maíz	20
1.3.- Biosíntesis de proteínas de reserva durante la formación del grano	22
1.4.- Síntesis de ácidos nucleicos durante el desarrollo del grano	26
1.5.- Hormonas durante la formación de la semilla	28
1.5.1.- Giberelinas	28
1.5.2.- Citocininas	29
1.5.3.- Acido abscísico	31
1.5.4.- Auxinas	34
2.- G E R M I N A C I O N . . . . .	37
2.1.- Captación de agua	37
2.2.- Metabolismo de ácidos nucleicos durante la germinación en cereales	41
2.2.1.- Acido desoxiribonucleico	41
2.2.2.- Síntesis de Acido ribonucleico	43
2.3.- Biosíntesis de Proteínas	46
2.4.- Activación de enzimas durante la germinación	48

2.5.- Aspectos bioenergéticos de la germinación	50
2.6.- Función de las fitohormonas durante la germinación	52
2.6.1.- Acido giberélico	52
2.6.2.- Acido abscísico	56
2.6.3.- Citocininas	58
2.7.- Participación de la Vía de las Pentosas durante la germinación	60
4) 3.- OBJETIVOS . . . . .	67
3) 4.- GERMINACION PREMATURA . . . . .	70
5.- MATERIALES Y METODOS . . . . .	73
5.1.- Determinación de la actividad de G6FDH	74
5.2.- Determinación de la relación $C_6/C_1$ durante la imbibición en diferentes tejidos de la semilla de maíz	93
5.3.- Efecto de Acido Giberélico, Cinetina y Actinomicina-D sobre la actividad de la G6FDH durante la germinación en embriones aislados de maíz.	100
5.4.- Efecto de $\alpha$ -amanitina y Cicloheximida sobre la actividad de la G6FDH durante la germinación en ejes embrionarios aislados de maíz	102
5.5.- Estimación de la proporción de radioactividad incorpo- rada en carbohidratos solubles en los tejidos a los que se les determinó la relación $C_6/C_1$	104
5.6.- Cromatografía bidimensional en placa fina de carbohi- dratos solubles	107
5.7.- Efecto de la concentración de proteína sobre la acti- vidad de la G6FDH	112

5.8.- Cromatografía de filtración en gel de las proteínas que precipitaron con sulfato de amonio al 70% de eje embrionario seco y determinación de su capacidad de inhibir a la G6FDH de eritrocito humano	114
5.9.- Gradiente de sacarosa de las fracciones de la columna de filtración en gel que mostraron capacidad inhibitoria contra la G6FDH de eritrocito humano	116
5.10.- Proteólisis con tripsina de las fracciones del gradiente de sacarosa 5-20% que presentaron actividad inhibitoria contra la G6FDH	118
5.11.- Comportamiento del inhibidor de la G6FDH durante la germinación	123
6.- RESULTADOS . . . . .	124
A.- GERMINACION NORMAL . . . . .	125
6.1.- Actividad enzimática de la G6FDH a diferentes tiempos de germinación en maíz (Gérmen 860-1373 pool dent).	127
6.2.- Actividad enzimática a diferentes tiempos de germinación en maíz (Tlaxcala VS 22E)	128
6.3.- Relación $C_6/C_1$ en eje embrionario aislado (Tlaxcala VS 22E)	131
6.4.- Relación $C_6/C_1$ en escutellum aislado (Tlaxcala VS 22E)	132
6.5.- Relación $C_6/C_1$ en embrión aislado (Tlaxcala VS 22E)	133
6.6.- Efecto de Acido Giberélico, Cinetina y Actinomicina-D sobre la actividad de la G6FDH durante la germinación en embriones aislados de maíz (Gérmen 860-1373 pool dent)	135

6.7.- Efecto de $\alpha$ -amanitina y Cicloheximida sobre la actividad de la G6FDH durante la germinación en ejes embrionarios aislados de maíz (Tlaxcala VS 22E)	136
6.8.- Distribución de marca radioactiva incorporada en carbohidratos solubles en eje embrionario aislado, escutellum aislado, eje embrionario unido y escutellum unido (Tlaxcala VS 22E)	139-142
6.9.- Actividad de G6FDH contra volumen de extracto enzimático	144
6.10.- Cromatografía de filtración en gel de la fracción protéica precipitada con sulfato de amonio al 70% de eje embrionario seco y determinación de su capacidad de inhibir a la G6FDH de eritrocito humano	145
6.11.- Gradiente de sacarosa de las fracciones de la columna de filtración en gel	146
6.12.- Peso molecular aproximado de la fracción protéica del gradiente de sacarosa con mayor capacidad inhibitoria	147
6.13.- Curva de Referencia de Acido Glutámico	148
6.14.- Curva de Referencia para la evaluación de la proteólisis con tripsina	149
6.15.- Comportamiento del inhibidor contra la G6FDH durante la germinación (Tlaxcala VS22E) 1979	150
B.- GERMINACION PREMATURA . . . . .	151
6.16.- Cuantificación de la actividad de la G6FDH durante la formación y maduración del grano en las variedades	



evaluadas en el ciclo agrícola 1980 (Tlaxcala, H-30, Criollo fertilizado, Criollo no-fertilizado)	154 - 155
6.17.- Cuantificación de la actividad de la G6FDH en diferentes variedades y ciclos agrícolas-	157
6.18.- Cuantificación de la actividad de la G6FDH durante la formación y maduración del grano en las variedades evaluadas en el ciclo agrícola 1981 (H-139, Criollo de Tlacamilco)	159
6.19.- Cuantificación de la actividad de G6FDH durante la germinación en las variedades evaluadas durante el ciclo agrícola 1981	161
6.20.- Cuantificación de relación $C_6/C_1$ durante la germinación en la variedad más susceptible a la germinación prematura: criollo de Huamantla	164
6.21.- Distribución de marca radioactiva en carbohidratos solubles en la variedad más susceptible a la germinación prematura: Criollo de Huamantla	165
6.22.- Actividad de G6FDH en todas las variedades, ciclos agrícolas y áreas de cultivo	167
7.- D I S C U S I O N . . . . .	169
A.- G E R M I N A C I O N   N O R M A L . . . . .	169
B.- G E R M I N A C I O N   P R E M A T U R A . . . . .	176
8.- B I B L I O G R A F I A . . . . .	182

RESUMEN

RESUMEN.-

Se determinaron las condiciones para la medición de la actividad de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de tejidos embrionarios de la semilla seca de maíz, cuantificando el perfil de actividad de ésta enzima durante la germinación en dos variedades: Tlaxcala VS 22E y Gérmén 860-1373 - pool dent. detectándose un máximo a las 6 horas de germinación predominantemente en eje embrionario (Figuras: 9, 10)

Se evaluó la actividad de esta enzima en presencia de fitohormonas y antibióticos, determinándose un incremento bajo la influencia de cinetina,  $AG_3$  - y un decremento en presencia de Cicloheximida, Actinomicina-D y  $\alpha$  amanitina (Tabla No. 7 Figura No. 11 ).

Con respirometría de Warburg se evaluó la actividad in vivo de la vía de las pentosas (Relación  $C_6/C_1$ ) detectándose un incremento en esta vía metabólica a las 6 horas de imbibición. (Tablas No. 4, 5, 6 ), coincidente con el máximo de actividad de la G6FDH determinada in vitro.

Se analizó la distribución de marca radioactiva en carbohidratos solubles a los tejidos sometidos a respirometría de Warburg; este análisis reveló una diferencia en la utilización y movilización de carbohidratos entre los tejidos embrionarios.

de la G6FDH

Se detectó un inhibidor de naturaleza protéica en eje embrionario seco - de Tlaxcala VS 22E que disminuye durante el proceso de germinación. (Fig. 22).

El análisis del patrón de actividad de la G6FDH durante la formación y - maduración del grano mostró una posible relación entre la susceptibilidad - a la germinación prematura y valores altos de esta enzima en eje embrio - nario así como carencia de inhibidor contra la G6FDH.

El análisis respirométrico y la distribución de marca radiactiva en car - bohidatos solubles efectuado en una variedad susceptible a la germinación - prematura (Criollo de Huamantla), parece indicar que una alteración en el - patrón de degradación e interconversión de carbohidatos puede ser un in - dicio de la sensibilidad a este fenómeno.

INTRODUCCION

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

El maíz, el arroz y el trigo son las plantas cultivadas de mayor importancia en el mundo. Entre las regiones de mayor producción de maíz se encuentran la zona conocida como la franja de maíz, que comprende parte de los estados de Iowa e Illinois que producen el 38% de la cosecha total de los Estados Unidos de Norteamérica que en total significa más de la mitad de la producción mundial de este cereal (7 080 millones de bushels). El resto es producido principalmente en el suroeste de Europa (Rusia, Rumanía, Yugoslavia, Hungría e Italia), China, Brasil, Africa del Sur, Argentina, India e Indonesia.

En 1978 los Estados Unidos de Norteamérica exportaron 2 000 millones de bushels que representan dos tercios de su producción total. Sus rendimientos se han incrementado de 1931 a la fecha en un 600% (Weber, E.J. 1980). La importancia que tiene este cultivo en todos los aspectos de la economía agrícola de nuestro país la representan su alto consumo y las grandes extensiones destinadas a su producción (en 1979 se cultivaron 7 043 122 Has, - SARH), pero los rendimientos obtenidos son relativamente bajos: 1.5 Ton/Ha. El maíz es una de las plantas cultivadas más estudiadas en términos agronómicos, citológicos, genéticos y desde el punto de vista de su evolución histórica bajo condiciones de domesticación. A pesar de ello, existen con-

flictos acerca de su origen, la hipótesis más antigua que persiste hasta la fecha sostiene que el maíz primitivo fue seleccionado por el hombre directamente del teocintle (Zea mexicana) o de un ancestro común a ambos.

Mangelsdorf y Reeves postulan que el teocintle es un producto secundario del tripsacum (Tripsacum spp) (Galinat, W.C. 1971).

El género Zea fue descrito por Linneo en 1754 y la especie mays por el mismo autor en 1805. A partir de entonces la literatura reporta 62 especies que son sinónimas de Zea mays L.. De estas 62 especies, 52 corresponden al nivel cultivado y 10 al nivel silvestre. El nivel silvestre de maíz lo representa el teocintle anual, descrito inicialmente por Heinrich A. Schrader como Euchlaena mexicana (Schrad.). Posteriormente Ascherson estudió desde el punto de vista morfológico al maíz y al teocintle, encontrando que ambas poblaciones eran muy similares, excepto en las características de la mazorca, por lo que concluyó que el maíz provenía del teocintle, sugiriendo que el género Euchlaena debía incluirse en el género Zea. Al mismo tiempo postuló al área del teocintle (México-Guatemala) como el lugar de origen del maíz (Miranda, C.S. 1979).

En maíz las investigaciones tendientes a incrementar su rendimiento se han centrado en la fisiología de la producción de materia seca: fotosíntesis, translocación de fotosintatos, respiración, (Tanaka, A. et al 1981), el incremento en el contenido de proteínas (Alexander, D.E. et al 1969; Nelson, O.E. et al 1970) y aminoácidos esenciales (Mertz, E. et al 1964).

La germinación (proceso que se inicia con la captación de agua y termina con la emergencia de la radícula o hipocotilo a través de las estructuras que integran la cubierta de la semilla: Bewley, J.D. and M. Black, 1978) es un evento de importancia agronómica vinculado a la viabilidad (capacidad de la semilla de sostener el desarrollo de la plántula; Moore, R.P. 1972), y al vigor (máximo potencial de la semilla para el establecimiento de la plántula; Bruce, M.P. 1972), de las semillas. Este fenómeno puede presentarse prematuramente (viviparidad) (Mangelsdorf, P.C. 1930, Eyster, W.H. 1931; Robertson, D.S. 1955; González, N.C. 1976), convirtiéndose en un problema de graves consecuencias económicas en cereales; (Mitchell, B. et al 1980; Gordon, I.L. 1980; Gastelum, R.F. 1981); ya que la germinación ocurre en las etapas iniciales de la desecación del grano, antes del período de cosecha, con la intervención de múltiples factores, ambientales y genéticos. De aquí la importancia del conocimiento relativo a los mecanismos que regulan la germinación. El aporte de esta clase de conocimientos ha permitido establecer estrategias agronómicas para la selección de cultivares con mejores características en función a su germinabilidad, como los trabajos de Nilsson - Ehle (1974) quienes describieron que la intensidad del color de la semilla de trigo y avena (rojos) generalmente va asociado a la resistencia al brotamiento. Así también, los experimentos de Miya-



moto, T. et al (1958) que sugirieron que este efecto no es causado por el pigmento flobafeno sino por sus precursores solu-  
bles: catequinas y catequinas-taninos.

El alto contenido de ATP cuantificado en cebadada (Ching, T. M. et al 1977), lechuga (Ching, T.M. et al 1972) y Brassica olera-cea L (Lunn, G. et al 1981) correlaciona con un alto porcentaje de germinación y vigor; la pérdida de vigor en centeno va acom-  
pañada con una disminución en la capacidad de síntesis de proteí-  
nas, ARN y retraso en la reparación de ADN (Sen, S. et al 1977; Peumans, W.J. et al 1981) y la acumulación de daños cromosómicos (Roberts, E.H. et al 1967).

Así también se han reportado una serie de cambios metabólicos que se presentan en las células del embrión de los cereales en el periodo de la germinación (Maijer 1980), una de las rutas me-  
tabólicas más importante que se considera puede ser determinante en este proceso, es la vía de las pentosas (Kovacs et al 1976), la cual aporta a las células tanto los metabolitos básicos para la síntesis de ácidos nucleicos (ribosa y desoxiribosa) como el poder reductor indispensable para diversas vías metabólicas vitales para la célula (Pilo et al 1981). De aquí que el estudio de los mecanismos que regulan la primera enzima (el paso limitante del ciclo) de la vía de las pentosas; la glucosa-6-fosfato deshi-  
drogenasa, pueda aportar conocimientos importantes en cuanto a la regulación de la germinación misma.

I.-ANTECEDENTES

## I.- ANTECEDENTES .

### I.1.- BIOLOGIA DE LA FORMACION DE LA SEMILLA.-

La semilla es una estructura única en el ciclo de vida de las plantas, es el resultado de la reproducción sexual y constituye esencialmente una planta en estado embrionario con excepcionales propiedades como son resistencia a extremos térmicos y longevidad bajo condiciones adversas. Desde esta perspectiva, el desarrollo de la semilla puede ubicarse como una preparación para la supervivencia durante la dispersión y subsecuente germinación (Balter, D. 1981).

Durante su formación, sus elementos se integran en un tiempo relativamente corto, por lo que la actividad sintética y la respiración son altas durante las etapas iniciales de formación de la semilla.

La fase vegetativa del maíz se inicia con el cigoto, el cual se deriva de la fecundación del huevo por el esperma, su división celular se inicia aproximadamente a las 12 horas después de la fecundación (Randolph, L.F. - 1936). Los órganos embrionarios: raíz, tallo, coleoptilo y escutelo se definen claramente a los 10 días después de la fecundación; el endospermo, resultado de la fusión de un esperma con 2 núcleos polares ( $3n$ ), inicia su división celular entre la tercera y cuarta hora después de la fecundación (Kiesselbach, T.A. 1980), continuando rápidamente y originando un endospermo con núcleos libres. Entre el tercero y cuarto día después de la fecun--

dación se inicia la formación de la pared celular y al quinto día, el endospermo es completamente celular. A los 20 días después de la fecundación desaparecen las figuras mitóticas. El cese de la división celular parte de la región central a la periférica, cuyas células diferencian en la capa de aleurona (Sass, J.E. 1955), que en semillas de cereales es un tejido secretor (Haberlandt, G.F.J. 1884) que no se divide con dos funciones principales: fuente de minerales y enzimas que durante la germinación movilizan las reservas nutritivas del endospermo para apoyar el desarrollo del embrión (Varner, J.E. et al 1976).

Funcionalmente pueden identificarse 3 fases durante el desarrollo del grano: Durante la fase inicial la división y diferenciación celular origina los tejidos vegetativos, pero en lugar de continuar hacia la formación de la plántula, evolucionan a una fase destinada a asegurar la supervivencia de la especie; durante la segunda fase y como preparación para la germinación se almacenan sustancias de reserva (la semilla madura presenta baja capacidad de captación de minerales y de compuestos nitrogenados). En la tercera fase se inicia una reducción gradual de la actividad metabólica a medida que el contenido de agua disminuye. (Boulter, D. 1981). Cuando el agua alcanza una concentración entre un 5-10% del peso de la semilla, ésta evoluciona a condiciones de vida latente (Mayer, A.M. et al 1980).

## I.2.- ACUMULACION DE CARBOHIDRATOS EN MAIZ.-

El contenido de almidón en las semillas de cereales se incrementa de manera constante durante su desarrollo alcanzando en la madurez entre el 65 y 70% de su peso seco (Duffus, C.M. 1979; Ingle, J. 1965).

La formación de almidón en maíz: 73% de amilopectina y 27% de amilosa (Kramer, H.H. et al 1958) se inicia, al igual que todas las reservas del grano (Ingle, J. 1965), alrededor de la segunda semana después de la fecundación.

En la semilla se pueden distinguir 2 gradientes de distribución en su patrón de acumulación: un gradiente mayor que va de la parte superior a la base del endospermo y otro menor en el que las células próximas a la superficie contienen menos gránulos de almidón que las células internas -- (Lampe, L. 1931; Shannon, J.C. 1974).

La concentración de sacarosa que se transloca al endospermo a través del pedicelo alcanza su máximo al final de la fase de división celular, aproximadamente a la mitad del período de formación del grano, entre los 20 y 28 días después de la fecundación (Ingle, J. 1965). La sacarosa es hidrolizada por la invertasa antes de ingresar al endospermo (Shannon, J.C. -- 1972; Shannon, J.C. et al 1972) y resintetizada en el interior donde es transformada en almidón a partir de glucosa-1-fosfato vía ADPG pirofosforilasa y ADPG glucosil transferasa (almidón sintetasa) (Ozbun, J.L. et -- al 1973; Leloir, L.F. et al 1961; Cardini, C.E. et al 1966). La almidón-

sintetasa en el endospermo de maíz está presente en dos formas: I y II, - cuya diferencia fundamental es la actividad catalítica que presentan con diferentes segmentos iniciadores (Preiss, J. et al 1980). Sus actividades pueden ser detectadas desde los 15 días después de la fecundación, alcanzando un máximo a los 30 días después de la misma (Joshi, S. et al 1980). La acumulación de almidón finaliza aproximadamente a los 46 días después de la fecundación (Ingle, J. 1965).

En Sorghum vulgare el máximo de acumulación de almidón se alcanza a los -- 40 días después de la fecundación, mientras que su velocidad de síntesis - es máxima entre el 12o. y 16o. día , disminuyendo al 36% del valor máximo hasta el 36o. día después de la fecundación (Singh, R. et al 1981).

En arroz esta velocidad máxima se alcanza alrededor del 7o. día después - de la fecundación (Singh, R. et al 1977).

Los enlaces glucosídicos ( $\alpha$ 1,6) presentes en la cadena de amilopectina son sintetizados por la acción catalítica de la enzima  $\alpha$ 1,4 glucan: 1,4 glucan-6-glucosil transferasa (enzima ramificante).

En el endospermo de maíz se han detectado 3 isoenzimas (I, IIb. y IIa). La actividad de estas 2 últimas coeluyen en una columna de DEAE celulosa con las actividades de la almidón sintetasa I y II respectivamente (Boyer, C. et al 1978b) postulándose que este complejo (almidón sintetasa: enzima ramificante) participa en la formación de las secciones asimétricas presentes en la estructura de la amilopectina (Preiss, J. et al 1980).

### I.3.- BIOSINTESIS DE PROTEINAS DE RESERVA DURANTE LA FORMACION DEL GRANO.

La biosíntesis de proteínas se incrementa a partir del 8o. día después de la fecundación alcanzando su máximo aproximadamente a los 28 días, disminuyendo a niveles poco significativos a los 45 días después de la fecundación (Rabson, R. et al 1961).

Entre el 25o. y 35o. día después de la fecundación el 80% de la capacidad de síntesis de proteínas reside en el endospermo, período en el que este tejido alcanza su máximo tamaño, e inicia inmediatamente después la fase de secado; el resto de la actividad acontece en el embrión. En los últimos estadios del desarrollo la contribución del endospermo declina rápidamente y en el embrión se efectúa el 75% de la síntesis de proteínas (Ingle, J. et al 1965).

A los 50 días después de la fecundación no se detecta actividad de síntesis de proteínas en estos tejidos, probablemente por las restricciones impuestas al sistema de biosíntesis de proteínas ocasionadas por la pérdida de agua y a la expansión del almidón y las proteínas de reserva (Ingle, J. et al 1965).

El patrón de acumulación de proteínas en el grano de maíz en desarrollo presenta las siguientes características: una fase inicial de incremento entre el 15o. y 20o. día después de la fecundación: período de elongación celular, continuando en forma estacionaria entre el 26o. y 36o. día, in--

crementándose rápidamente después del 37o. día (Ingle, J. et al 1965).

El comportamiento de la fase inicial refleja, probablemente, la biosíntesis de enzimas y proteínas estructurales necesarias para el metabolismo y crecimiento del endospermo, el segundo incremento que ocurre cuando disminuyen la capacidad de síntesis de proteínas y la concentración de aminoácidos es el reflejo de un evento terminal en el proceso de formación del endospermo: la síntesis de proteínas de reserva (Ingle, J. et al 1965).

Estas proteínas fueron clasificadas por Osborne (Osborne, T.B. 1895, 1924) en función de su solubilidad en 4 grupos: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas, cuyas características fundamentales son:

- 1.- Tienen como función predominante la de constituir la reserva de nitrógeno y azufre (en algunos casos de carbono) de la semilla, por lo que son movilizadas durante la germinación (Lea, P.J. et al 1983).
- 2.- Son acumuladas en un período relativamente tardío en el desarrollo del grano (Jones, R.A. et al 1977b).
- 3.- Su síntesis es estimulada preferencialmente al suministrarle nitrógeno asimilable a la planta. (Lowe, L.B. et al 1972).
- 4.- Una especie determinada generalmente contiene proteínas de una clase de solubilidad (Tabla I) y ésta consiste en series polimórficas de polipeptidos relacionados (Gianazza, E. et al 1977).
- 5.- Son codificadas por un número relativamente pequeño de loci, conte---



niendo cada uno un número de secuencias duplicadas, en maíz éstos están localizados en los cromosomas : 4,5,7 y 10 (Soave, C. et al 1978, 1979) - Valentini, G. et al 1979).

6.-Se acumulan específicamente en los órganos de almacenamiento (Perno - llet, J.C. 1978).

7.-Se almacenan en los cuerpos protéicos (Mifflin, B.J. et al 1981) (Müntz - K. et al 1981).

El patrón de acumulación de la zeína en el endospermo de maíz, es típico de la mayoría de las prolaminas de cereales; y puede ser detectable alrededor de los 12 días después de la polinización, continuando su síntesis hasta aproximadamente 40 días después de la fecundación (Jones, R.A. et al - 1977b).

T A B L A 1.-

CONTENIDO DE PROTEINAS EN SEMILLAS DE CEREALES (Brohult, S. et al 1954; -  
Konzak, C.F. 1977).

SEMILLA	% DEL TOTAL DE PROTEINAS				
	CONTENIDO DE PROTEINAS (% EN PESO SECO)	ALBUMINAS (SOLUBLES EN AGUA)	GLOBULINAS (SOLUBLES EN SALES)	PROLAMINAS (SOLUBLES EN ALCOHOL)	GLUTELINAS (SOLUBLES EN ALCALIS)
MAIZ	7 - 13	TRAZAS	5 - 6	50 - 55 Zeína	30 - 45
TRIGO	10 - 15	3 - 5	6 - 10	40 - 50 Gliadina	30 - 40
ARROZ	8 - 10	TRAZAS	2 - 8	1 - 5 Corizina	85 - 90
SORGO	9 - 13	TRAZAS	TRAZAS	60 Kafirina	-----
CENTENO	9 - 14	5 - 10	5 - 10	30 - 40 Secalina	30 - 50
CEBADA	10 - 15	3 - 4	10 - 20	35 - 45 Hordeína	35 - 45
AVENA	8 - 14	1	80	10 - 15 Avenina	5

#### I.4.- SINTESIS DE ACIDOS NUCLEICOS DURANTE EL DESARROLLO DEL GRANO DE MAIZ.

El perfil de los ácidos nucleicos durante la primera fase del desarrollo de la semilla de maíz muestra un incremento similar tanto en el endospermo como en el embrión hasta que cesa la división celular (aproximadamente entre el 20o. y 25o. día después de la fecundación). A partir de este período su contenido disminuye en el endospermo y se mantiene de manera ascendente en el embrión hasta la madurez (Ingle, J. et al 1965).

En trigo, durante la primera fase de desarrollo del grano, el ARN ribosomal es el componente predominante (Ramagopal, S. et al 1979).

El patrón de actividad de la enzima ARN polimerasa, dependiente de ADN tipo II, presenta un incremento en el endospermo de maíz (Mans, R.J. et al 1979) y en el grano de trigo (Greene, F.C. 1983) a partir del 12o. día -- después de la fecundación, disminuyendo su actividad hasta el 50% de su valor máximo entre el 18o. y 20o. día después de la misma.

En trigo, la acumulación de ARN poliadenilado se inicia alrededor del 12o. día después de la fecundación, alcanzando su valor máximo entre el 15o. y 18o. día, decreciendo a partir de este período, su disminución correlaciona con el incremento en la síntesis de proteínas de reserva. La velocidad de la síntesis de estas proteínas durante la segunda fase está directamente relacionada, y posiblemente controlada, por los niveles de ARN mensajeros traducibles (Greene, F.C. 1983).

En el embrión de maíz, la enzima ARN polimerasa dependiente de ADN tipo II mantiene, de manera ascendente, su patrón de actividad durante todo su desarrollo (Mans, R.J. 1979). Estos tejidos conservan durante la fase de secado los componentes necesarios para la síntesis de proteínas durante la subsecuente etapa de germinación (Ingle, J. et al 1965; Weeks, D.P. et al 1971; Payne, P.I. 1976; Sánchez de Jiménez, E. et al 1981).

## I.5.- HORMONAS DURANTE LA FORMACION DE LA SEMILLA Y LA PLANTA.

En la etapa de formación de la semilla se ha descrito la acumulación o síntesis de fitoreguladores, algunos de ellos están involucrados en procesos relacionados con su desarrollo o durante el proceso subsecuente de germinación.

### I.5.1.- GIBERELINAS.

Para esta familia de compuestos (Hedden, P. et al 1978) se han descrito - al menos 4 sitios de síntesis: punta de raíz (Sitton, D.A. et al 1967), - hojas jóvenes (Jones, R.L. et al 1966), tallos tiernos (West, C.A. 1973), y semillas en desarrollo (Coolbaugh, R.C. et al 1971).

En leguminosas, las semillas en desarrollo es el sitio de mayor actividad biosintética y de acumulación de giberelinas (Lang, A. 1965).

En semillas de trigo maduras se han identificado 6 giberelinas: GA<sub>15</sub>, -- GA<sub>17</sub>, GA<sub>19</sub>, GA<sub>20</sub>, GA<sub>24</sub>, y GA<sub>44</sub> (Gasking, P. et al 1980).

Durante la madurez de las semillas los niveles de giberelina libre disminuyen, esta disminución va asociada con un incremento en los niveles de giberelina conjugada, principalmente a carbohidratos (Mounla, R.K. et al 1973).

Los parámetros del desarrollo en los que se ha encontrado una estrecha - relación con niveles elevados de giberelinas son: el incremento en peso de la semilla y el diámetro de frutos en Pisum sativum (Coolbaugh, R.C. - et al 1969), Phaseolus vulgaris (Wareing, P.F. 1967), Prunus americana L.

(Jackson, D.F. 1966) y Citrus sinensis (Wiltbank, W.J. et al 1969).

En maíz, los niveles endógenos de giberelinas son los que más fuertemente limitan el rendimiento (Cherry, J. et al 1960; Rood, S.B. et al 1983) y la heterosis para un vigoroso crecimiento correlaciona con una alta concentración de sustancias con actividad de giberelina (Nickerson, N.H. -- 1959; Nickerson, N.H. et al 1960; Rood, S.B. 1983).

#### I.5.2.- CITOCININAS.-

Desde el aislamiento y caracterización de la zeatina, a partir de semillas inmaduras de maíz (Letham, D.S. 1963), se han aislado e identificado a nivel estructural 15 compuestos con actividad de citocinina en plantas (Letham, D.S. 1983).

En Phaseolus vulgaris y Xanthium strumarium se ha identificado a la raíz como el principal tejido en donde se efectúa la síntesis de citocininas, distribuyéndose al resto de la planta a través del xilema (Wareing, P.F. et al 1977).

En cereales, los niveles de actividad de citocinina son elevados durante el desarrollo de la semilla: 11  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso fresco en maíz (Letham, D. S. 1963), 120 ng/semilla en trigo (Jamerson, P.E. et al 1982), este mismo comportamiento se presenta en leguminosas (Van Staden, J. 1983).

A estos compuestos se les ha asociado con diversos procesos: alargamiento y división celular (Letham, D.S. et al 1961), síntesis de tubulina (Fos-

ket, D. et al 1981), activación de la fase de elongación durante la biosíntesis de proteínas (Klämbt, D. 1977), y de las ARN polimerasas dependientes de ADN I y II (Kulaeva, O.N. 1981).

A las citocininas se les ha correlacionado con los eventos que se desarrollan durante la formación de la semilla y en la movilización y acumulación de nutrientes: en trigo los niveles de zeatina se incrementan al máximo de su valor durante la etapa de formación del endospermo, entre el 30. y 140. día después de la fecundación (Jamerson, F.E. et al 1982).

En maíz, la concentración de citocininas endógenas está directamente relacionada con la velocidad fotosintética y con el incremento en carbohidratos y aminoácidos (Jesko, T. et al 1980).

La aplicación de cinetina incrementa el contenido de almidón en Ricinus communis (Raja- Kumar, N., et al 1980).

Durante la formación de la semilla, en Pisum sativum (Barrows, W.J. et al 1970) y Lapinus albus (Davey, J.E. et al 1979), el contenido de citocininas en el endospermo alcanza su valor máximo: 80% del total detectado en la semilla madura, durante su fase de mayor incremento en volumen, entre la 3a. y 6a. semana después de la fecundación. Este tejido, durante su fase activa, funciona como un proveedor de nutrientes al embrión, sus niveles de citocininas disminuyen a medida que se desarrollan los cotiledones y el embrión, indicando, durante esta etapa, que los niveles de citocininas estaban asociados con el desarrollo transitorio del endospermo y no con -

el metabolismo del embrión (Van Staden, J. 1983).

### I.5.3.- ACIDO ABCISICO.-

El ácido abscísico, al igual que las giberelinas, es sintetizado en diversos tejidos: hojas, tallos, frutos y semillas (cotiledones, endospermo, - embrión) (Milborrow, B.V. et al 1973).

Los niveles de esta hormona tienen una estrecha correlación con diversos procesos del desarrollo y fisiología de las plantas, ejemplo: efector de la función estomatal, escisión de órganos, germinación prematura o viviparidad, etc.

Existen evidencias incuestionables indicando que el ácido abscísico puede causar el cierre de los estomas (Horton, R.F. 1971; Little, C.H.A. et al 1968; Mittelheuser, C.J. et al 1969), al mismo tiempo se ha descrito una estrecha relación entre los niveles endógenos de esta hormona y la respuesta al cierre de los estomas en las plantas mesófitas sometidas a déficit de agua (Mansfield, T.A. et al 1981; Milborrow, B.V. 1981; Radin, J.W. et al 1982; Walton, D.C. 1980).

En el proceso de apertura y cierre estomatal están involucrados procesos de intercambio de iones: cuando los estomas se abren las células guarda captan iones, que son liberados cuando éstos se cierran (Walton, D.C. — 1980). Se ha propuesto que el ácido abscísico ejerce su acción inhibiendo este intercambio de iones (Raschke, K. 1977).



Larqué- Saavedra et al (1974, 1976) detectaron una correlación positiva - entre los niveles de ácido abscísico y la resistencia a sequía en sorgo y maíz, abriendo la posibilidad a las técnicas agronómicas de hibridación - para la búsqueda de plantas con un metabolismo óptimo de esta hormona para regular la función estomatal (Walton, D.C. 1980).

Durante el proceso de escisión de órganos (flores, frutos, hojas, etc.), - se ha hipotetizado que el ácido abscísico tiene primariamente una función promotora (Addicott, F.T. et al 1977).

Desde el punto de vista anatómico- fisiológico este proceso involucra el desarrollo y actividad de 2 capas: una de separación y otra de protección (Addicott, F.T. et al 1977). Las células de la capa de separación excretan enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular, ejemplo: las pectinasas (Morré, D.J. 1968; Riov, J. 1974), las celulasas (Reid, P.D. et al 1974), cuyo patrón de actividad es incrementado por ácido abscísico y etileno (Craker, L.E. et al 1969; Abeles, F.B. 1969; Abeles, F.B. et al - 1971; Lewis, L.N. et al 1970). El etileno, además de inducir la síntesis de novo de celulasas, favorece la síntesis de ARN y proteínas en la zona de escisión (Abeles, F.B. et al 1966).

Se ha sugerido que otro mecanismo, mediante el cual el ácido abscísico - ejerce su control en el proceso de escisión de órganos es interviniendo - en el transporte y la distribución de fotosintatos (Allsopp, A. 1965).

En Lupinus luteus, el transporte de sacarosa y asparaginina de las partes vegetativas a los órganos reproductores es inhibido por la aplicación de ácido abscísico (Porter, N.G. 1981). Otros procesos de transporte que son inhibidos por ácido abscísico son el de la captación y transporte de fósforo en girasol (Erlandsson, G. et al 1978), y el de auxinas y carga de -- sacarosa en P. vulgaris (Besaler, E. et al 1974; Vreugdenhil, D. 1983).

Algunos hallazgos han permitido relacionar la elevada concentración de -- esta hormona cuantificada, principalmente en el embrión de numerosas espe-- cies, durante la etapa de máximo incremento en peso seco: P. vulgaris (Hsu, F.C. 1979); Glycine max L. (Quebedeaux, B. et al 1976), Gossypium hirsutum (Davies, L.A. et al 1972); H. vulgare (Goldbach, H. et al 1977), T. aesti-- vum (King, R.W. 1976) con su probable participación en procesos relacio-- dos con el desarrollo de la semilla a durante la etapa de germinación.

En la semilla de trigo, la capacidad del ácido giberélico de inducir la -- producción de  $\alpha$  amilasa y la germinación disminuyen en función de los -- niveles de ácido abscísico acumulados durante la etapa de maduración del grano (King, R.W. 1976).

Dure, L.S. (1975) postula una participación directa de esta hormona duran-- te la embriogénesis en algodón. Durante este proceso, el ácido abscísico sintetizado en el óvulo es transportado al embrión en donde inhibe la -- traducción de ARN mensajeros, específicos de la fase de germinación, im-- pidiendo durante esta fase la germinación prematura o viviparidad.

En el maíz, las mutantes que germinan prematuramente (vivíparas) tienen, ya sea niveles reducidos de ácido abscísico (Brenner, M.L. et al 1977; -- Mc Daniel, S. et al 1977), o baja sensibilidad a la inhibición del crecimiento, en respuesta a la aplicación de esta hormona (Smith, J.D. et al - 1978).

#### I.5.4.- AUXINAS.

Este grupo de hormonas: ácido indol-acético, ácido 4-cloro-indol-3-acético y ácido fenil-acético (Cohen, J.D. et al 1982) se biosintetizan en las partes tiernas del tallo, principalmente (Libbert, E.S. et al 1966) y son transportados polarmente al resto de la planta (Goldsmith, M.H.M. 1977).

Influyen en diversos procesos: dominancia apical, formación de raíces, -- tropismos, caída de órganos, diferenciación vascular, elongación (Bonner, B. et al 1976), inducen la síntesis de  $\beta$  1,4-glucan-4-glucano hidrolasa (Byrne, H. et al 1975), y la de ARN (Key, J.L. et al 1967). Sus niveles elevados durante la formación de la semilla en algunas especies: Abelmoschus esculentus L., Lycopersicon esculentum, están asociados con el período de formación del endospermo (Malik, C.P. et al 1980).

En la semilla de maíz, la acumulación y esterificación de auxinas a carbohidratos se efectúa en el endospermo, preponderantemente durante la tercera fase del desarrollo del grano (Cohen, J.D. et al 1983), estos compuestos son movilizados en la etapa de germinación. Cuando ésta se inicia, la

enorme cantidad de auxina (Tabla 2), es movilizada rápidamente a razón de 1% por hora (Bandurski, R.S. 1983).

T A B L A 2

ACIDO INDOL-3-ACETICO Y SUS CONJUGADOS EN LA SEMILLA DE MAIZ (+)

Compuesto	Cantidad en peso seco (mg/kg)	Porcentaje del total
Acido indol-3-acético	0.5	0.8
Indol-3-acetil mio-inositoles	10	15
Indol-3-acetil mio-inositol arabinósidos	15	23
Indol-3-acetil mio-inositol galactósidos	5	8
Indol-3-acetil glucano	35	53

(+).- (Bandurski, R.S. 1983)

Estos ésteres son transportados hacia las zonas meristemáticas más rápidamente que la auxina libre (Nowacki, J. et al 1980) en donde, al ser hidrolizados, promueven el crecimiento de la planta (Bandurski, R.S. 1983).

Las funciones de los elevados niveles de hormonas detectados durante la--  
formación y maduración de la semilla, se pueden agrupar en 3 grupos:

1.- Control del crecimiento y desarrollo de la semilla.

2.- Control de la captación de nutrientes hacia la semilla durante la fa-  
se de intensa acumulación.

3.- Acumulación para su posterior participación en el control de la germi-  
nación y crecimiento de la plántula (Bewley, J.D. et al 1978).

## 2. - GERMINACION

En este proceso que se inicia con la captación de agua y finaliza con la emergencia de la radícula (Bewley, J.D. et al 1978), están involucrados un conjunto de eventos sucesivos: imbibición, activación del metabolismo, extensión y división celular y emergencia de la radícula o hipocotilo. (Berlin, G.P. 1972).

Para hacer posible esta transición se conjugan numerosos procesos metabólicos y condiciones ambientales, entre los que se encuentran :

- 1.-Captación de agua.
- 2.-síntesis de ácidos nucleicos.
- 3.-Síntesis de proteínas.
- 4.-Activación de enzimas.
- 5.-Regulación hormonal.
- 6.-Bioenergéticos.
- 7.-Via de las pentosas.

### 2.1.-CAPTACION DE AGUA.

Como el metabolismo activo depende de la presencia de agua, un paso crítico hacia la germinación es la captación de agua (la mayoría de las enzimas presentan un máximo de actividad catalítica cuando el contenido de agua alcanza entre 0.3 y 0.6 g de agua/g de proteína, en este rango de concentración se restablece el ambiente alrededor del sitio activo y aumenta la velocidad de difusión de los sustratos y productos (Stevens, E. et al 1979

La captación de agua se efectúa a través de un proceso de imbibición que está determinado por 3 factores: la composición de la semilla, la permeabilidad de las cubiertas y la disponibilidad de agua en el medio. Durante la imbibición el agua solvata a las partículas coloidales y ocupa los espacios intercoloidales ; el hinchamiento subsecuente de estas partículas provoca una presión a la que se le denomina Presión de Imbibición, fenómeno de relevancia para el desarrollo de la germinación, ya que produce la ruptura de las cubiertas favoreciendo la implantación (Mayer, A. M. et al 1982).

Las cubiertas tienen una profunda influencia sobre la germinación, ya que intervienen en diversos procesos: captación de agua, intercambio gaseoso, difusión de imbibidores endógenos, e imponen restricción mecánica al crecimiento del embrión (Mayer, A.M. et al 1982).

Aún no es claro cómo las cubiertas adquieren su impermeabilidad al agua; experimentos realizados en el género Pisum (P. sativum, permeable al agua, P. fulvum y P. elatius impermeables al agua), han sugerido un mecanismo en el cual participan el oxígeno, compuestos fenólicos y la catecol oxidasa, que conduce a la formación de taninos en las semillas que son impermeables al agua (Marrach, I. et al 1974).

El patrón de captación de agua en la mayoría de las semillas presenta 3 fases: la fase I o de imbibición es dependiente del potencial hidratacional, éste se atribuye a la capacidad de las matrices (pared celular y contenido celular) de unir agua.

Durante la fase siguiente: Fase II, las semillas mantienen, en fase lag,

altos niveles de hidratación. En estas fases, I y II, los patrones de captación de agua ocurren independientemente de la viabilidad de la semilla (viable o no viable) y de si la misma se encuentra en estado latente.

Desde un punto de vista general, el concepto de latencia en un sistema biológico se aplica a la suspensión temporal del crecimiento activo, ésta puede ser impuesta por condiciones físicas desfavorables (poca disponibilidad de agua, temperaturas bajas, etc.). Si el crecimiento se reactiva al restablecerse las condiciones favorables se le denomina Latencia Temporal, si éste no se restablece se le denomina simplemente Latencia, (Moore, T.C. 1979).

Por su asociación con la germinación visible, la Fase III únicamente la muestran las semillas que pueden desarrollar esa capacidad. Los procesos metabólicos que conducen a la germinación se inician en la Fase de imbibición (Fase I), pero cualitativa y cuantitativamente los procesos metabólicos previos a la germinación ocurren durante la Fase II (la rehidratación de semillas que se habían imbibido bajo condiciones limitantes de agua, permite reducir el tiempo de la Fase II, lo que indica que los procesos que conducen a la germinación ya se habían iniciado durante esta fase). La expansión celular que permite la elongación de la radícula — indica el estado final de la germinación, esto presumiblemente ocurre — porque el agua, al ingresar a la célula, incrementa la presión de turgor, provocando la expansión de la pared celular.



La germinación, cuando es posible, está asociada a 2 factores principalmente:

1.- La reducción en el potencial osmótico de las células de la radícula trae como consecuencia la captación de más agua del ambiente, que al ingresar, incrementa la presión de turgor.

2.- La modificación de las propiedades estructurales y mecánicas de la pared celular que hacen posible la expansión celular.

El incremento en la captación de agua, que ocurre en la Fase III, está asociado inicialmente con la disminución de los potenciales hídrico y osmótico, este último producido por la hidrólisis de las sustancias de reserva.

La duración de cada fase dependerá de las propiedades intrínsecas de las semillas, ejemplo: cantidad de sustratos hidratables, permeabilidad de las cubiertas, captación de oxígeno, tamaño, etc., y de las condiciones de imbibición, ejemplo: niveles de humedad, temperatura (Bewley, J. D. et al 1978).

La disminución en la captación de agua en semillas expuestas a bajas temperaturas se atribuye al incremento en la viscosidad del agua (Murphy, J. B. et al 1982).

El proceso de imbibición en maíz se inicia a través del pericarpio, aumentando de volumen rápidamente, las primeras células que se reactivan son las del meristemo radicular y las de la coleoriza (Sass, J. E. 1955).

## 2.2.-METABOLISMO DE ACIDOS NUCLEICOS DURANTE LA GERMINACION EN CEREALES.

### 2.2.1.-ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO:

La captación de agua transforma al embrión latente temporalmente (con bajos niveles metabólicos) a un estado de desarrollo activo ; la síntesis de macromoléculas, como ADN, ARN y proteínas, que se encontraba suspendida, también se reactiva con el inicio de la imbibición.

En maíz, la síntesis de ADN se reactiva entre las 50 y 70 horas después de la imbibición, los primeros tejidos en asumirla son los de la punta de la raíz, la coleoriza y la región del nudo escutelar (Stein, O. L. et al 1963).

En el embrión de trigo, la síntesis de ADN medida por incorporación de timidina tritiada se inicia en la primera hora después de la imbibición (Tabla No. 3, Blowers, 1979), permaneciendo a bajos niveles. Su ascenso a las 18 horas de imbibición (Buchowicz, J. 1974) depende de la síntesis de novo de la enzima ADN polimerasa, dependiente de ADN (Mory, Y.Y. et al 1975). Pero no obstante el notable incremento en la actividad de esta enzima (8 veces a las 18 horas de imbibición respecto a la actividad cuantificada en el embrión seco), la síntesis de ADN, en trigo, no es indispensable para el desarrollo de la germinación, ya que rangos de inhibición en su síntesis hasta de un 75% no la afectan (Datta, K. et al 1983). Sin embargo, es necesario aclarar que no existe un criterio uniforme en lo que se designa como germinación. Para algunos autores la germinación

se completa cuando se observa la emergencia de la radícula o hipocotilo (Bewley, J.D. et al 1978; Berlyn, G.P. 1972), mientras que para otros, - este proceso está delimitado por el inicio de la síntesis de ADN y el de la división celular (Osborne, D.S. 1980, 1981).

### 2.2.2.-SINTESIS DE ACIDO RIBONUCLEICO.

En ejes embrionarios aislados de maíz, la fase I del proceso de captación de agua se completa entre la 3a. y 4a. hora después de iniciada la imbibición. La síntesis de ARN puede ser detectada en la región radicular desde el inicio de la imbibición, preferencialmente en la región nucleolar (Fakan, S. et al 1981).

La reactivación de la síntesis de ARN en ejes embrionarios aislados de maíz se observan 3 estadios sucesivos:

El estadio 1 (hasta la 2a. hora después del inicio de la imbibición), se caracteriza por la síntesis de ARN heterodisperso nuclear, rico en adeninas y bajos niveles de ARN de transferencia.

El estadio 2 (entre las 24 y 48 horas después de iniciada la imbibición), está caracterizado por la síntesis de precursores de ARN ribosomal y ARN heterodisperso nucleolar, y

El estadio 3 (a partir de las 48 horas después de iniciada la imbibición) en el que se procesan los precursores de ARN ribosomal y se sintetiza ARN heterodisperso nuclear (Van de Walle, C. et al 1976).

El ARN heterodisperso nuclear es procesado rápidamente, originando el ARN mensajero funcional, estas moléculas pueden detectarse en polisomas a las 2 horas después del inicio de la imbibición (antes que finalice la fase I de captación de agua).

En maíz, la traducción de estas moléculas de ARN mensajeros sintetizados de novo se efectúa cuando un reducido número de ribosomas preformadas son

incorporadas a polisomas. El ARN ribosomal sintetizado es indetectable en la fase I de captación de agua, lo que indica que durante la germinación en maíz, el tiempo requerido para el arribo de ARN ribosomal al citoplasma es más largo que el del ARN mensajero (Dommes, J. et al 1983). No obstante la rapidez en la transferencia de estas moléculas del núcleo al citoplasma, estudios efectuados con inhibidores de la transcripción en trigo, ubican a los ARN mensajeros almacenados como los compuestos sobre los que recae la biosíntesis de proteínas en mayor proporción durante la fase II de imbibición, ya que la inhibición de la ARN polimerasa tipo II dependiente de ADN, con  $\alpha$ -amanitina incluso a valores del 40% a las 8 horas de imbibición, afectan ligeramente el crecimiento del embrión (Datta, K. et al 1983).

En trigo, cuando sus embriones se imbiben a 0°C por 75 minutos y se transfieren a 25°C, la síntesis de ARN ribosomal y ARN mensajero puede ser cuantificada a los 10 minutos; estas moléculas migran del núcleo al citoplasma en donde pueden detectarse entre los 30 y 90 minutos después del inicio de la imbibición (Spiegel, S. et al 1975).

En este cereal, el ARN mensajero representa el 25% del total que se transfiere entre la 1a. y 6a. horas después del inicio de la imbibición. Entre la 6a. y 18a. horas siguientes, la velocidad de síntesis de ARN ribosomal se incrementa 10 veces, este incremento coincide con el período de expansión celular y con un aumento significativo del nivel de actividad de la

ARN polimerasa tipo I dependiente de ADN (Mazús, B. et al 1976).

Han sido reportados diversos mecanismos que pueden participar en la regulación de la velocidad y tipos de ARN que se sintetizan durante la germinación en cereales; entre estos se postula la existencia de un control a nivel de fosforilación-defosforilación de la ARN polimerasa tipo II dependiente de ADN (Mazús, B. et al 1980) y de las proteínas cromosomales, cambiando este último mecanismo la actividad de molde de la cromatina (Trewavas, A. 1979), (Sasaki, K. et al 1982).

Otros posibles puntos de control lo representan los niveles de actividad de las ARN polimerasas dependientes de ADN y la concentración de ribonucleótidos, los embriones de trigo en estado seco, contienen niveles altos de actividad de la ARN polimerasa tipo II dependiente de ADN, los cuales permanecen constantes durante las primeras 24 horas de germinación; su actividad se incrementa entre las 24 y 36 horas de iniciada la germinación (Mazús, B. et al 1976); mientras que la actividad de la ARN polimerasa tipo I dependiente de ADN que se encuentra baja en el embrión en estado seco, se incrementa entre la 6a y 36a horas de germinación. (Spiegel, S. et al 1975). La velocidad de transcripción puede estar controlada por los bajos niveles de ribonucleótidos, en los embriones secos de trigo, los ribonucleótidos de pirimidina se encuentran a un nivel inferior a 1 pmol/mg de peso seco (Cheung, C.P. et al 1978).

### 2.3.- BIOSINTESIS DE PROTEINAS:

En cereales, la operatividad del sistema de síntesis de proteínas se inicia con la captación de agua; en los ejes embrionarios aislados de maíz, la síntesis de proteínas puede ser detectada durante la primera hora de imbibición (Sánchez de Jiménez, E. et al. 1981), a los 20 min de imbibición en trigo (Chen, D. et al 1968) y a los 15 min en arroz y centeno (Bhat, S.P. et al 1975) (Sen, S. et al 1975).

En maíz, esta reactivación de la síntesis de proteínas en las etapas iniciales de imbibición no es afectada significativamente por la adición de inhibidores de la síntesis de ARN mensajero (Sánchez de Jiménez, E. et al 1981) lo que sugiere que al menos en esta etapa la síntesis de proteínas no depende exclusivamente de la síntesis de novo de ARN mensajero (Dommes, J. et al 1983).

La mayor actividad de síntesis de proteínas en maíz se concentra en el eje embrionario (Sánchez de Jiménez, E. et al 1981), en centeno, las células de la coleoriza son las primeras en iniciar la síntesis de proteínas (después de 15 min de imbibición) (Sen, S. et al 1974), en cebada, los mayores incrementos en la síntesis de proteínas lo presenta la raíz en desarrollo (a las 5.5 - horas de iniciada la germinación). (Stoddard, J.L. et al 1973).

El incremento en la capacidad de síntesis de proteínas del embrión de trigo parece ser obligatorio para la germinación, la inhibición de la síntesis de proteínas durante la imbibición (Cicloheximida 5  $\mu\text{g/ml}$ ) causa una inhibición-

del incremento secundario en peso fresco por más del 90% a las 16.5 horas y del 80% a las 22 horas de germinación. Si los embriones se trasladan a un medio libre de cicloheximida, pueden recuperar su capacidad de incrementar su peso fresco después de 5.5 horas, esta evidencia indica que se requiere de un periodo previo de síntesis de proteínas para el crecimiento ulterior de embrión. (Marcus, A. et al 1975).



#### 2.4.- ACTIVACION DE ENZIMAS DURANTE LA GERMINACION.

La germinación de las semillas está caracterizada por un incremento en la actividad de la mayoría de los sistemas enzimáticos y por la aparición de nuevos sistemas enzimáticos.

Algunas enzimas que se produjeron durante la formación y desarrollo de la semilla se transforman a formas inactivas en la madurez, las que son reactivadas inmediatamente con el inicio de la captación de agua, ej.: la zeatina oxidasa en maíz; triosa fosfato isomerasa, fosfo fructocinasa, malato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en chícharo (Gordon, I.L. 1980).

Otro grupo de enzimas se activan en un período posterior al inicio de la imbibición, este grupo de enzimas requiere, generalmente, de otros factores adicionales al de la imbibición para manifestar su actividad.

Un tercer grupo de enzimas son activadas tardíamente, estas requieren de síntesis de proteínas.

Por último, algunas actividades enzimáticas se manifiestan previa activación de genes, síntesis de ARN mensajero y síntesis de proteínas (Mayer, A.M. 1977).

La interacción proteína:proteína es uno de los mecanismos (que no requiere síntesis previa de proteínas) que puede modular la actividad de algunos sistemas enzimáticos en los estadios iniciales de la germinación.

Los embriones secos de trigo contienen un factor protéico asociado a cro-

Matina, que es capaz de estimular la actividad de la ARN polimerasa tipo II dependiente de ADN (Walerych, W. et al 1982).

En Agrostemma githago se ha detectado un inhibidor glicoprotéico de las ARNt sintetasas (Hecker, M. et al 1974).

La actividad de la alcohol deshidrogenasa de maíz es regulada por la presencia de un inhibidor protéico; el incremento en la actividad de esta enzima durante el desarrollo de la germinación está asociado con el decremento de este inhibidor (Ho, D.T.H., et al 1975).

En R. communis, el incremento en las actividades de la G6PDH y la aldolasa, se ha atribuido a la activación de las enzimas pre-existentes (Bianchetti, R. et al 1965).

### 2.5.- ASPECTOS BIOENERGETICOS DE LA GERMINACION.

La semilla en estado seco manifiesta baja actividad metabólica, su transición del estado de reposo al de germinación va acompañada por un rápido incremento en la actividad biosintética dependiente de energía; la cantidad de ATP disponible es un factor limitante para la actividad biosintética de proteínas (Marcus, A. et al 1966) y el desarrollo de la germinación (Ching, T.M. et al 1972).

El eje embrionario de trigo en estado seco contiene bajos niveles de ATP, la mayoría de sus adenilatos se encuentran en la forma de AMP (Oberndorf, R.L. et al 1974); durante los primeros 20 minutos de imbibición los niveles de ATP se incrementan en más de 100 veces (Brooker, J.C. et al 1977), mostrando solamente ligeras variaciones durante las 15 horas siguientes (Oberndorf, R. et al 1974).

El AMP es transformado presumiblemente vía ADP a ATP (Tabla 3) (Brooker, J.C. et al 1977).

#### NIVELES DE NUCLEOTIDOS DE ADENINA EN EJES EMBRIONARIOS DE TRIGO DURANTE LA GERMINACION.

	ATP	ADP	AMP	TOTAL	CARGA ENERGETICA
	(nmoles/125 mg de embriones)				
Secos	1	47	159	207	0.12
20 min	133	26	13	172	0.85
40 min	161	23	5	189	0.91
3 horas	250	23	8	281	0.93
5.5 h	259	24	3	286	0.95

TABLA No.3

Este rápido incremento no puede estar relacionado con la fosforilación oxidativa, ya que las mitocondrias (remanentes de la fase de reposo) no se han estructurado y son ineficientes para la síntesis de ATP, esta actividad se incrementa a medida que la imbibición progresa. En este desarrollo están involucrados aparentemente 2 aspectos: la incorporación a la membrana mitocondrial de proteínas pre-existentes en el citoplasma y a la formación de nuevas mitocondrias (Sato, S. et al 1975).

Aunque la actividad glicolítica en la fase inicial de la germinación es mayor que la del ciclo de Krebs, es difícil que pueda contribuir significativamente a incrementar los niveles de ATP en las primeras horas de imbibición (Mayer, A.M. 1977).

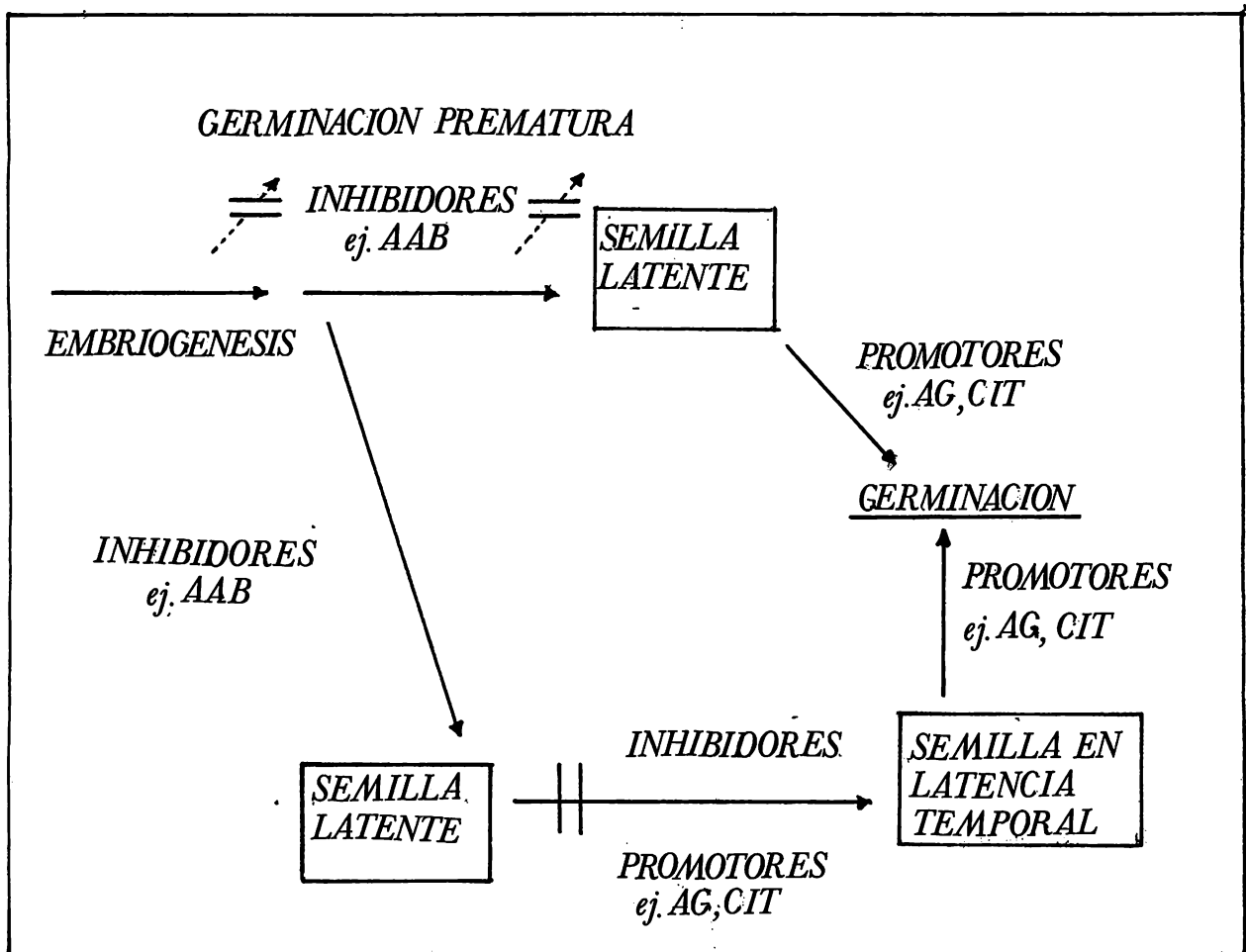
## 2.6 .-FUNCION DE LAS FITOHORMONAS DURANTE LA GERMINACION.-

Las fitohormonas: ácido giberélico, ácido abscísico y citocininas, participan en el control de diversos procesos durante la formación y la germinación de las semillas, Fig. 1, (Black, M. 1980/1981).

### 2.6.1 .-ACIDO GIBERELICO.-

En cebada, el ácido giberélico remanente del proceso de formación del grano y el que se sintetiza durante la germinación (principalmente en el escutellum (MacLeod, A.M. et al, 1966) y en la región nodal del eje embrionario (Radley, M. 1967), difunde desde el inicio de la imbibición hacia las células de la capa de aleurona en las que regula la producción y secreción de enzimas hidrolíticas, ej.: amilasa (Filner, P. et al 1967), proteasa (Jacobsen, J.V, et al 1967) y ribonucleasa (Bennet, P.A, et al 1972), las cuales movilizan las sustancias de reserva del endospermo para apoyar el desarrollo del embrión (Chrispeels, M.J. et al 1967), (Ho, D.H.H. 1979) (Mozer, T.J. = 1980).

En las células aisladas de la capa de aleurona, el proceso de incremento en la producción de amilasa, promovido por la aplicación de ácido giberélico presenta 2 fases: Una fase lag entre la tercera y cuarta hora (en este periodo, se inicia la transcripción del ARN mensajero que codifica para la síntesis



sis de  $\alpha$ -amilasa (Mozer, T.J., 1980), y una segunda fase de rápida y constante acumulación de esta enzima después de la 12a. hora de su adición. El ácido giberélico interviene en la primera fase, incrementando la transcripción del ARN mensajero que codifica la síntesis de  $\alpha$ -amilasa (Bernal-Lugo, I. et al 1981). El incremento en la producción de  $\alpha$ -amilasa que se inicia después de las 12 horas de tratamiento no está sujeto a control transcripcional ya que los niveles de su ARN mensajero permanecen constantes entre la 14a. y 32a. hora, y la adición de inhibidores de la transcripción (cordicepina) al inicio de esta fase (12a. hora) no bloquea su incremento, sugiriendo que el ARN mensajero que la codifica se transcribe durante las 12 horas iniciales (Ho, D.F.H. 1980).

En este tejido el ácido giberélico promueve, además, la formación de retículo endoplásmico rugoso (Jones, R.L. 1969a, 1969b; Vigil, E.L. et al 1973). Este incremento (medido por la incorporación de  $^{32}\text{P}$  en fosfolípidos de membrana, se inicia entre la 3a. y 4a. hora, alcanzando su máximo a la 12a. hora después de su adición: Evins, W.H. et al 1971), puede representar un aumento en el recambio de fosfolípidos (conversión de lípidos almacenados a lípidos de membrana) mediado por ácido giberélico ya que esta hormona incrementa la actividad de 2 enzimas involucradas en la formación de lecitina: la fosforil colina citidil transferasa y la fosforil colina glicérido transferasa a los 15 minutos después de su aplicación, efecto que no depende de síntesis de proteínas (Ben-Tal, Y. et al 1974).

Como la actividad de la fosforil colina glicérido transferasa es inhibida por calcio, la activación de esta enzima puede atribuirse a la redistribución de este ión mediado por ácido giberélico (Ho, P. T. H. 1979).

En embriones aislados de maíz, la adición de ácido giberélico produce un incremento entre el 20 y el 40% en la síntesis de ARN a las 4 horas de imbibición; en el escutellum, el ARN ribosomal es la fracción que se incrementa en mayor proporción (Wielgat, B. et al 1974); en lechuga, la aplicación de esta hormona durante el proceso de germinación no incrementa la síntesis de ARN pero sí la de proteínas y la formación de polisomas (Fountain-D.W. et al 1976).

Su asociación con el proceso de ruptura de la latencia, proviene de los hallazgos efectuados en Corylus avellana L. en donde la finalización de este periodo correlaciona con un incremento en los niveles de  $AG_1$  y de  $AG_9$  en un rango de 40 y de 300 veces respectivamente (Williams, P.M. et al 1974).

Su aplicación durante la captación de agua a semillas latentes de Avena fatua produce un incremento en la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Kovacs, M.I.P. et al 1976).



### 2.6.1- ACIDO ABSCISICO.

Durante el desarrollo de las plantas se producen cambios en la disponibilidad de hormonas (conjugada/libre), así mismo variaciones en la relación interhormonal, indicando que las transiciones entre las diferentes etapas fisiológicas pueden estar controladas por los niveles hormonales relativos: relación activador/inhibidor (Khan, A.A. 1975). Esta relación controla la producción de  $\alpha$ -amilasa en las células de la capa de aleurona en cebada, la adición de ácido abscísico a este sistema no bloquea la secreción de proteínas, pero sí regula el efecto promotor que ejerce el ácido giberélico sobre la producción de  $\alpha$ -amilasa, aparentemente a través de 2 mecanismos: mediante la reducción del ARN mensajero que codifica para la síntesis de esta enzima (a las 12 horas después de la adición) y reduciendo su traducción, particularmente en la etapa final de la segunda fase (Thomas, J.V.H. et al 1982).

En lechuga, la síntesis de proteínas en las etapas iniciales de la germinación (4a. hora después del inicio de la captación de agua) es inhibida por la adición de ácido abscísico, este efecto es contrarrestado por citoquininas y ácido giberélico (Fountain, D.W. et al 1976).

Del mismo modo, en embriones aislados de trigo la síntesis de proteínas es inhibida por ácido abscísico y promovida por ácido giberélico únicamente dentro de las primeras 6 horas de imbibición (Chen, D. et al 1970).

En algunas especies (Rosa sp y Fraxinus americana) el mantenimiento de la latencia correlaciona con una concentración elevada de ácido abscísico

(Jackson, G.A.D. 1968; Sonheimer, E. et al 1968).

En Sinapsis alva, el mecanismo de inhibición de la germinación mediado por esta hormona está ubicado primariamente a nivel del control del proceso de captación de agua y no en la modulación de la síntesis de ácidos nucleícos y proteínas (Schopfer, P. et al 1979).

### 2.6.3- CITOCININAS.

Las citocininas participan en diversos procesos biológicos, ej.: incrementan la síntesis de ARN (Chen, D. et al 1970; Kulaeva, O.N. 1981), favorecen la formación de polisomas (Fountain, D.W. et al 1976), estimulan la citocinesis (Miller, C.O/ et al 1955), y la síntesis de proteínas (Gefter, M.L. et al 1969).

Como todas las fitohormonas, las citocininas ejercen una acción primaria sobre la permeabilidad de la membrana, esta interacción puede afectar la velocidad de hidratación, la liberación de enzimas, el transporte y la concentración de iones, el pH, y el contenido y la disponibilidad de sustratos, procesos de significancia en el desarrollo y control de la germinación (Veldstra, H. 1944).

Un efecto rápido, en segundos, de este grupo de hormonas, es el de aumentar la permeabilidad de las membranas al agua y a la glucosa (en membranas artificiales: Stillwell, W. et al 1983), y la captación de potasio en los cotiledones de girasol (Ilan, I. et al 1971).

Las citocininas estimulan la germinación en algunas especies, ej.: en pera (Khan, A.A. et al 1968), en ejes embrionarios de frijol (Sussex, I. et al 1975), y en lechuga (Fountain, D.W. 1976), efecto que es revertido por el ácido abscísico en todos los casos.

En maíz existe poco intercambio de citocininas entre el eje embrionario y el escutellum durante las etapas de captación de agua e inicial de la germinación, a diferencia del existente entre estos tejidos con respec-

to al transporte de giberelinas (esta hormona es exportada del eje embrionario al endospermo durante la imbibición, Jacobsen, J.V. et al, 1979), ya que a las 72 horas después de la aplicación de 8(<sup>14</sup>C)t-zeatina a embriones de maíz en germinación, el 74% del compuesto no transformado se localiza en el eje embrionario, indicando el poco intercambio entre estos tejidos. Su alta concentración en eje embrionario refleja su activo metabolismo con respecto al endospermo (Van Staden, J. 1981).

## 2.7.- PARTICIPACION DE LA VIA DE LAS PENTOSAS DURANTE LA GERMINACION.

La glicólisis y el ciclo de Krebs no son las únicas rutas oxidativas de carbohidratos que se activan durante la germinación (Mayer, M. et al 1980). La vía de las pentosas, tercera ruta de oxidación e interconversión de carbohidratos suministra a la célula diversos compuestos que son fundamentales en el metabolismo intermediario: (Fig. 2 )

- 1) NADPH extramitocondrial
- 2) Ribosa-5-fosfato
- 3) Fructosa-6-fosfato
- 4) 3-fosfogliceraldehido
- 5) Eritrosa-4-fosfato.

El incremento en la actividad de la vía de las pentosas está asociado a diversos procesos metabólicos: elongación celular, en raíces de chícharo (Sutcliffe J.F. et al 1974); síntesis de ARN y ligninas en el extremo apical del hipocotilo, en Phaseolus mungo (Ashihara, H. et al 1975); y en células en cultivo in vitro de Vinca rosea la máxima actividad de esta ruta coincide con el máximo consumo de oxígeno y de síntesis de ARN (Kanamori, I. et al 1979). En semillas de Avena fatua, la ruptura de la latencia está asociada con el incremento en la actividad de la Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (Kovacs, M.I.P. et al 1976); y en las semillas de Corylus avellana L. la ruptura de la latencia mediante la exposición a bajas temperaturas (Fig. No. 3 ) coincide con el incremento en la actividad de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (Fig. No. 4 ) (Gosling, P. et al 1980).

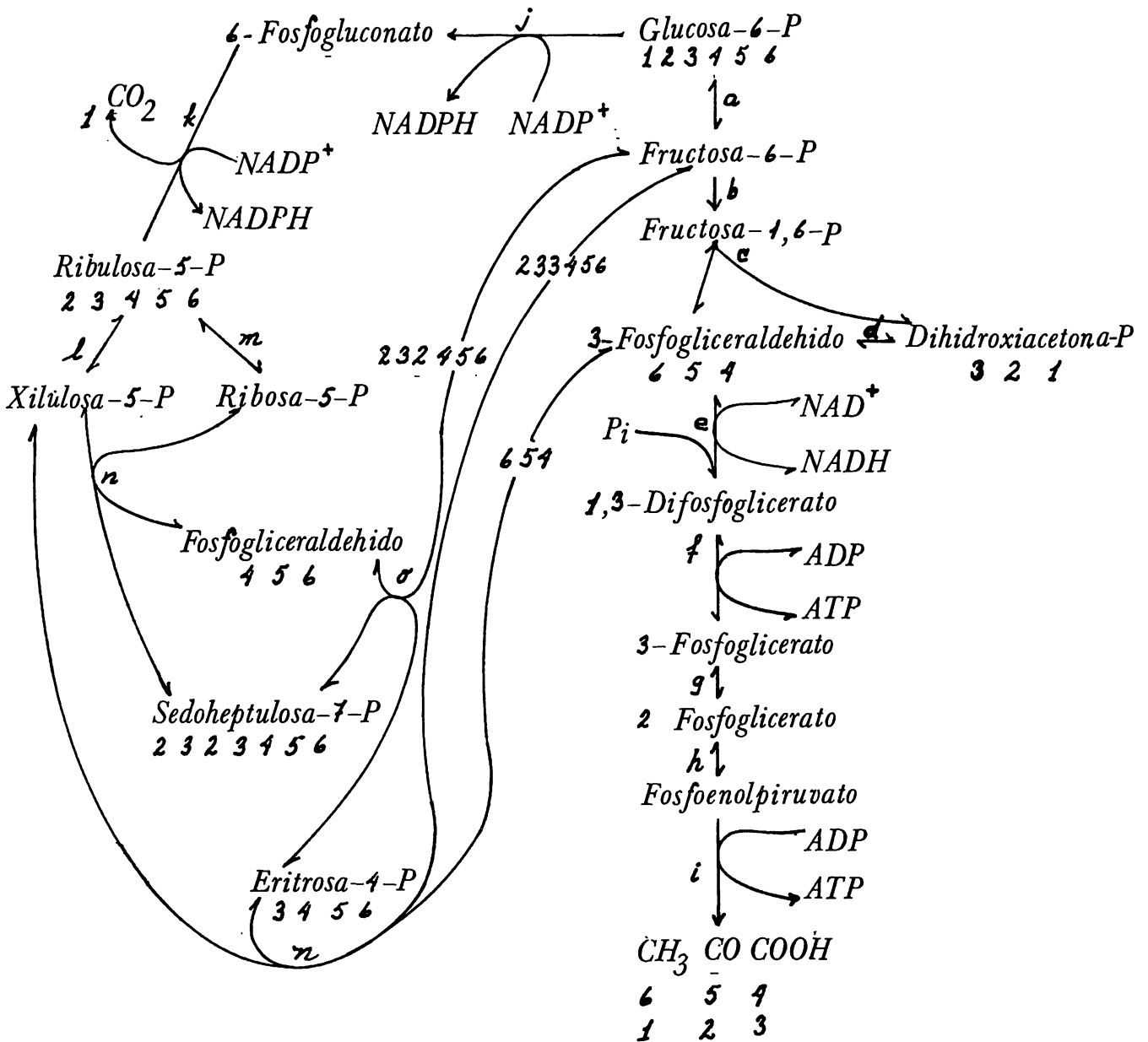
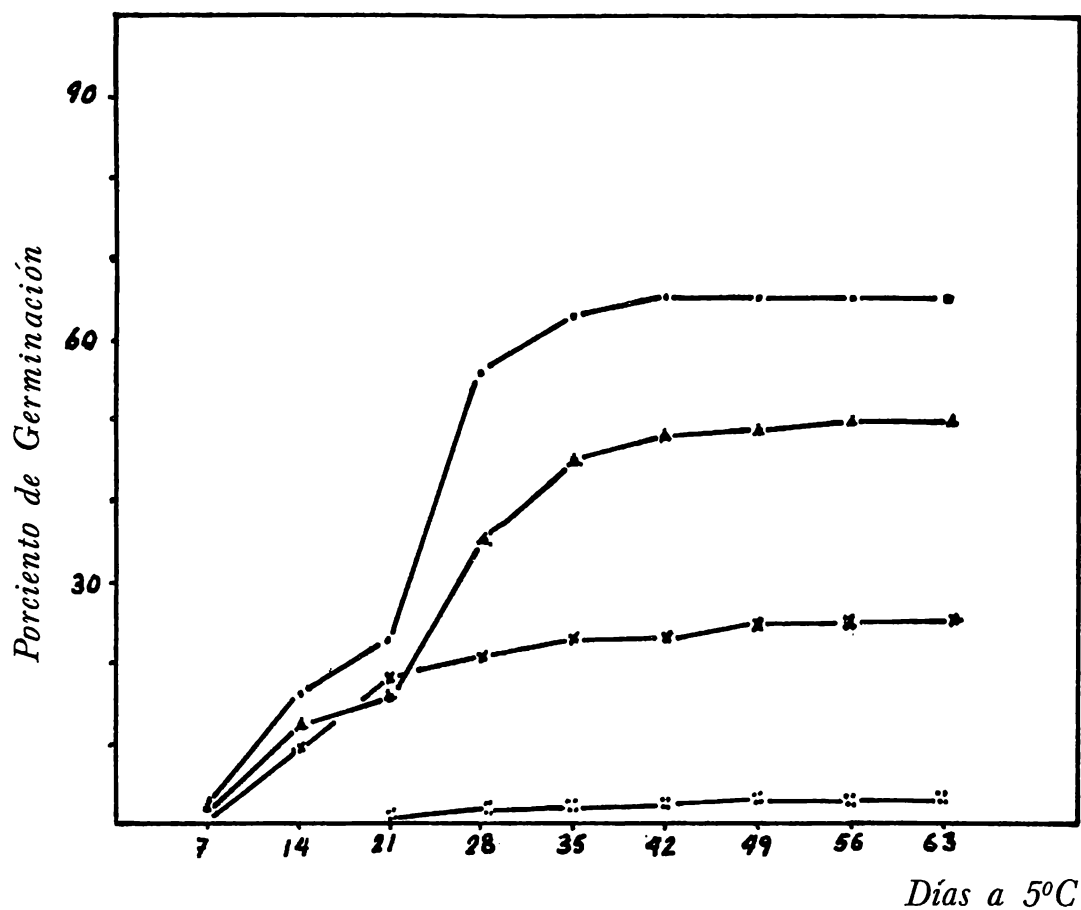


Figura No.2.-Vía de las pentosas y sus relaciones con la vía glicolítica. enzimas involucradas: a=Glucosa fosfato isomerasa; b=Fosfofructocinasa; c=Fructosa-1,6-difosfato aldolasa; d=Triosa-fosfato isomerasa; e=Gliceraldehido - fosfato deshidrogenasa; f=Fosfoglicerato cinasa; g=Fosfogliceromutasa; h=Enolasa; i=Piruvato cinasa; j=G6FDH; k=6-fosfogluconato deshidrogenasa; l=Ribulosa fosfato 3 epimerasa; m=Ribosa fosfato isomerasa; n=Transcetolasa; o=Transaldolasa. (Ap Rees, T.1980) Nota: Los números muestran la forma en que cada vía redistribuye los átomos de carbono de la glucosa-6-fosfato.



0 días a 20°C .- □-□  
 14 días a 20°C .- ▣-▣  
 21 días a 20°C .- ▲-▲  
 28 días a 20°C .- ●-●

Figura No.3.-Ruptura de la latencia de semillas de Corylus avellana L. mediante tratamiento a baja temperatura.(Gosling,P.G. et al 1980).

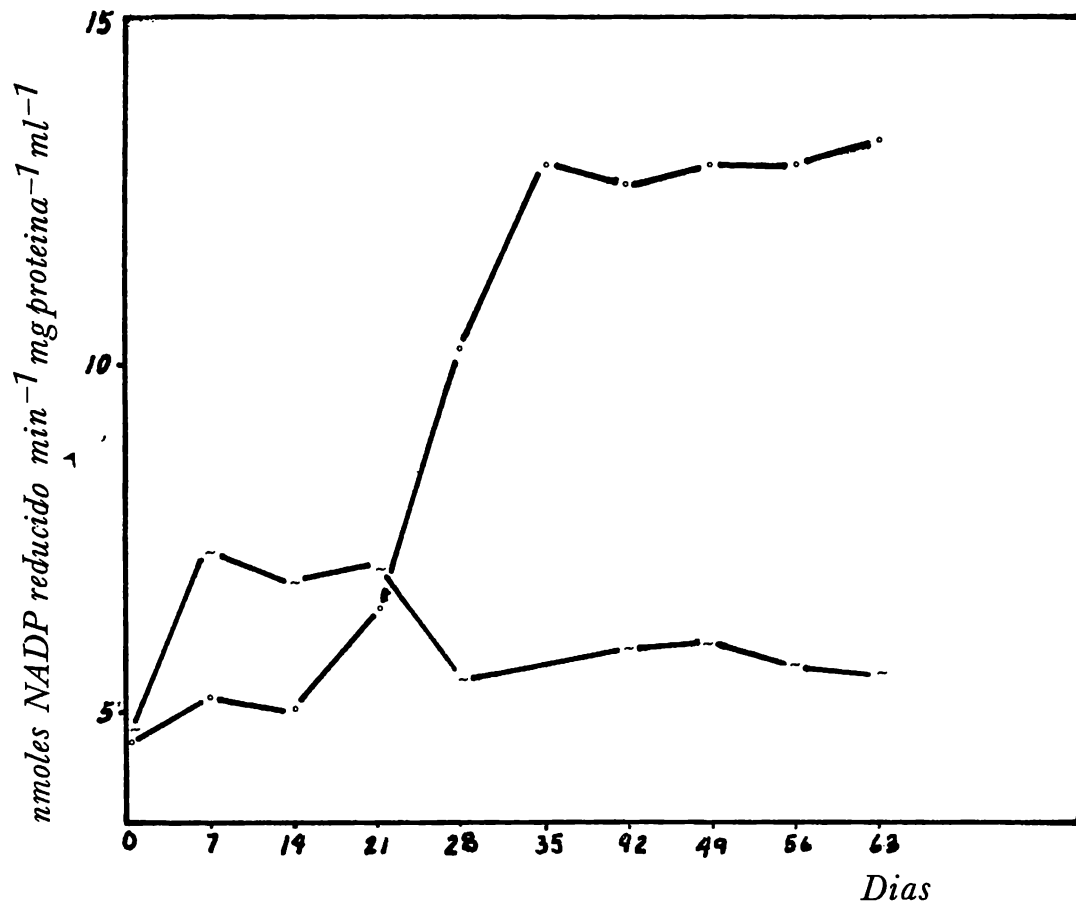


Figura No.4.-Niveles de actividad de la G6PDH en Corylus avellana L.durante la ruptura de la latencia y germinación.(Gosling,P.G. et al 1980).



Esta primera enzima de la vía de las pentosas, cataliza la formación de 6-fosfogluconolactona, la cual en una segunda reacción es hidrolizada ya sea de manera no-enzimática o mediante la enzima lactonasa, produciendo 6-fosfogluconato (Horecker, B.L. et al 1953) (Brodie, A.F. et al 1955). El incremento en su actividad está asociado directamente al aumento en la síntesis de lípidos, ácidos nucleicos y a células en activa división (Pilo, B. et al 1977, 1981) (Iyengar, S. et al 1981).

La determinación de la relación de acción de masas de todas las reacciones que conforman la vía de las pentosas en diferentes tejidos: Hípcotilo de Phaseolus mungo (Ashihara, H. et al 1974a, 1974b); Hígado de rata (Greenbaum-A.L. et al 1971) ubicó a esta reacción: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa + Lactonasa, como la única desplazada del equilibrio (el cambio de energía libre in vivo es de  $-11.4$  Kcal. Bassham, J.A. 1973), por lo tanto; cinéticamente irreversible (Crabtree, B. et al 1979) y con probable función regulatoria (Newsholme, E.A. et al 1973).

Los estudios cinéticos realizados con la enzima proveniente de glándula mamaria de rata (Shreve, D.S. et al 1980) y de camote (Muto, S. et al 1972), indicaron que el control fino in vivo de esta enzima está determinado por la relación  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  (Turner, J.F. et al 1980) (La glucosa-6-fosfato, incrementa la afinidad al  $\text{NADP}^+$  y contrarresta la inhibición que ejerce sobre -



3.-Cuando se suministra glucosa ( $^{14}\text{C}$ -1 y  $^{14}\text{C}$ -6), una fracción de la ribulosa-5-fosfato es transformada en piruvato. (Ap Rees, T. 1980).

El metabolismo de la glucosa a través de la vía glicolítica predice que la distribución de marca radiactiva (carbono-14) está en equilibrio tanto en C-1 como en C-6 en todos los compuestos subsecuentes a las triosas fosfato, por su parte, el metabolismo de la glucosa a través de la vía de las pentosas resultará inicialmente en un exceso de  $\text{CO}_2$  eliminado de  $^{14}\text{C}$ -1 en preferencia al eliminado de  $^{14}\text{C}$ -6, resultando por lo tanto un exceso de marca proveniente de  $^{14}\text{C}$ -6 sobre  $^{14}\text{C}$ -1 en la ribulosa-5-fosfato y compuestos derivados (ácidos orgánicos, aminoácidos etc. Ap Rees, T. 1980).

La cuantificación del  $\text{CO}_2$  que se libera cuando se suministra glucosa marcada con  $^{14}\text{C}$  en el átomo de carbono 6 ó en el átomo de carbono 1 se ha utilizado como un parámetro para comparar la contribución de las vías glicolítica y de pentosas a la degradación de hexosas (Ap Rees, T. 1980). El resultado se expresa como una relación:  $\text{C}_6/\text{C}_1$ ; una relación alta indica una activa vía glicolítica, mientras que una relación baja indica una vía de pentosas activa. (Bloom, B. et al 1953) (Bewley, J.D. 1979).

3. A.- GERMINACION PREMATURA.

Morfológicamente el programa de desarrollo de las angiospermas puede dividirse en 3 estadios:

- 1.- Fecundación y desarrollo del embrión y de la semilla.
- 2.- Detención del desarrollo del embrión y de la semilla.
- 3.- Germinación y crecimiento.

La detención del desarrollo es un mecanismo genéticamente programado para proteger al embrión de las condiciones adversas, ejemplo: anaerobiosis, -deshidratación, exceso de agua, de temperatura, etc.) durante la diseminación y subsecuente germinación.

En maíz han sido identificadas mutantes en todas las etapas de su programa de desarrollo (Coe, E.H. et al 1977, Neuffer, M.G. et al 1968).

En maíz, Mangelsdorf (1923) describió y clasificó en 3 grupos básicos una serie de mutantes defectuosas:

- 1.- Defectuosas completas: en este tipo de mutantes el desarrollo del óvulo se detiene inmediatamente después de la fecundación.
- 2.- Defectuosas parciales: en este caso el desarrollo se detiene después de que se ha generado una pequeña cantidad de endospermo.
- 3.- Mutantes vivíparas: en las cuales el embrión de la semilla madura no ingresa al estado de latencia temporal (o detención del desarrollo), germinando prematuramente.

En este fenómeno, que se presenta también en otras especies, el embrión

germina y la plántula crece a pesar de que el cariopsis o fruto no ha — completado la madurez y aún está unido a la planta madre.

Se ha demostrado que la viviparidad en maíz está controlada por alelos de diferentes loci ( $a_1$ ,  $vp_1$ ,  $vp_2$ ,  $vp_5$ ,  $vp_7$ ,  $vp_8$ ,  $vp_9$ ,  $w_3$ ,  $y_9$ , y  $z$ ) (Robertson, D.S. 1955, 1961).

Todas las mutantes vivíparas de maíz son pleitrópicas y afectan una gran variedad de caracteres: clorofilas, carotenoides, tamaño de la semilla y de la planta, latencia temporal y germinación (Robertson, D.S. 1955).

La existencia de mutantes vivíparas parece indicar que el estado de latencia temporal es opcional, en lugar de una etapa obligatoria del desarrollo (Sussex, I. 1978). Esta hipótesis recibió apoyo experimental al lograrse que germinaran in vitro, sin pasar por el estado de latencia temporal, embriones inmaduros aislados de numerosas especies (Raghaven, V. - 1976, Johri, B.M. 1982).

Se ha hipotetizado que durante la formación de la semilla el ácido abscísico promueve la detención del desarrollo del embrión. Sussex (1978) propuso un mecanismo en el cual la deficiencia de agua funciona como una señal que genera un incremento en la concentración de esta hormona en los estadios finales del desarrollo de la semilla. El ácido abscísico, acumulado mediante este mecanismo, actúa como un inhibidor de la transcripción, suprimiendo, a este nivel, la síntesis de proteínas necesarias para la germinación, impidiendo la viviparidad. Sin embargo, no se conocen los — mecanismos mediante los cuales el ácido abscísico ejerce este efecto.

Se han analizado los niveles endógenos y los efectos de aplicaciones exógenas de ácido abscísico sobre las mutantes vivíparas de maíz. Las mutantes  $vp_1$  contienen niveles normales de ácido abscísico (Robichaud, C. S. - et al 1979), mientras que las mutantes vivíparas  $vp_2$ ,  $vp_5$ ,  $vp_7$ ,  $vp_9$ ,  $a_1$  y  $w_3$  contienen niveles de ácido abscísico por abajo de los valores "normales" (Brenner, M.L. et al 1977). Muestran, además, alteraciones en la biosíntesis de carotenoides. Esta vía, a su vez, comparte precursores con una de las posibles rutas de biosíntesis de ácido abscísico (Milborrow, B. 1974).

Las mutantes  $vp_5$  tienen únicamente bloqueada la biosíntesis de ácido abscísico, mientras que las mutantes  $vp_7$ ,  $vp_8$ , y  $vp_9$  presentan un doble bloqueo: en la captación y en su biosíntesis; a su vez, la mutante  $vp_1$  puede tener un bloqueo a nivel del receptor del ácido abscísico ya que no responde a la aplicación exógena de esta hormona (Robichaud, C.S. et al 1980).

<sup>10</sup>  
67

4 <sup>1</sup> ~~3~~ - OBJETIVOS

### 3.- O B J E T I V O S .

La importancia de la vía de las pentosas dentro del metabolismo intermedio se manifiesta por la diversidad de precursores que genera para otros procesos metabólicos: 6-fosfogluconato (Warburg, O. et al 1935), ribulosa-5-fosfato y ribosa-5-fosfato (Horecker, B.L. et al, 1951), sedoheptulosa-7-fosfato y triosa fosfato (Horecker, B.L. et al 1952), eritrosa-4-fosfato, precursor de L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptofano y sustancias fenólicas incluyendo ligninas (Higuchi, T. et al 1967).

En Ricinus communis, la fase oxidativa de esta vía (Figura 2 ) proporciona del 51 al 68% del NADPH requerido para la síntesis de ácidos grasos (Agrawal, P.K. et al 1971), el 50% en Persea americana (Kikuta, Y. et al 1969), y en Helianthus tuberosus L. contribuye con el 60-80% del NADPH necesario para la síntesis de ligninas (Pryke, J.A. et al 1977).

Durante la germinación y finalización del período de latencia se ha descrito que esta ruta puede tener funciones regulatorias en ambos procesos (Roberts, E.H. 1969; 1973; Mayer, A.M. et al 1966; Ashihara, H. et al 1977; Gosling, P.G. et al 1980; Kovacs, M.I. et al 1976; La Croix, L. et al 1967). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales esta actividad es regulada en estos estadios no se han determinado.

Los objetivos de este trabajo son:

A) Determinar los factores que regulan la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa durante la germinación, en diferentes tejidos de la semilla



de maíz.

B) Determinar la importancia de esta ruta metabólica durante la germinación prematura de este cereal.

5.- M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

5.1.-DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (Kornberg, A., et al 1954).

PRINCIPIO:

Esta técnica de cuantificación de la actividad enzimática (prueba óptica) fue introducida por Warburg (Warburg, O. 1936) y se fundamenta en la propiedad que tienen los nucleótidos reducidos de adenina (NADH y NADPH) de absorber luz con un pico máximo a 340 nm, mientras que sus formas oxidadas no muestran absorción entre 300 y 340 nm del espectro. En presencia de exceso de sustratos, la velocidad de reducción de  $\text{NADP}^+$ , en este caso, es proporcional a la cantidad de enzima presente.

REACCION:



UNIDAD DE ENZIMA:

La unidad de enzima se definió como la cantidad que causa un cambio de absorción de 0.001/min.

REACTIVOS:

1.- Glucosa-6-fosfato 0.02M.

Sobre un baño de hielo se agitan 522 mg de Glucosa-6-fosfato (sal de Bario) en 25 ml de ácido acético 0.02M por 30 minutos. Adicionar 2.0 ml

de sulfato de potasio 0.57M y se agita nuevamente por 30 minutos. Se remueve el precipitado de sulfato de bario por centrifugación a 2 500 rpm por 10 minutos. La solución sobrenadante se neutraliza con hidróxido de potasio 0.2M y se afora a 42.5 ml.

2.-  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.1M

3.- Amortiguador de medición (AM):

Glicina 0.04M pH 7.5

4.-  $NADP^+$  1250  $\mu$ M; Solución de Trabajo (ST).

#### EQUIPO:

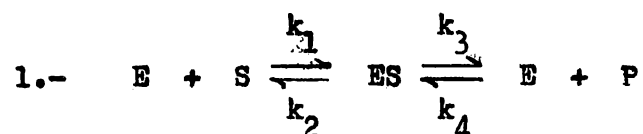
1.- Espectrofotómetro PyE UNICAM SP 1800

2.- Graficador AR 25

#### METODO (Ensayo Cinético).

INTRODUCCION.- De la expresión lineal de la ecuación de Michaelis-Menten

(Ecuación No. 3):



$$2.- \quad v_o = \frac{v_{\max} [S_o]}{k_m + [S_o]}$$

$$3.- \quad v_o = \frac{k_3 E_m [S_o]}{k_m + [S_o]}$$

en donde:

$V_0$  = Velocidad inicial

$[S]_0$  = Concentración inicial de sustrato

$E_T$  = Enzima total (E + ES)

$k_3$  = Constante

$k_m$  = Constante

se establece que la cuantificación de  $V_0$  en un sistema permitiría conocer la concentración de enzima, ya que éstas son directamente proporcionales,  $k_m$  y  $k_3$  son constantes, y  $[S]_0$  se puede conocer de las condiciones de ensayo (Clark, J.M. et al 1977).

El procedimiento más simple para la medición de  $V_0$  consiste en utilizar altas concentraciones de sustrato con el propósito de mantener siempre S aproximadamente igual a  $[S]_0$  para que su disminución (transformación) durante el período de análisis sea insignificante; bajo esta condición, la velocidad de reacción después de 5 minutos o eventualmente 30 minutos puede ser igual a la velocidad a la cual se inició. Con el transcurso del tiempo la concentración del sustrato podrá llegar a concentraciones limitantes o la concentración del producto formado inhibir la reacción.

Si la concentración de  $[S]$  que se utiliza es baja, ej.:  $[S] = k_m$ , la velocidad de la reacción decrecerá continuamente a medida que disminuye la concentración del sustrato, haciendo difícil la estimación de  $V_0$ .

Otro parámetro que es indispensable establecer experimentalmente es la cantidad de enzima a la cual se obtiene la actividad máxima y constante en

este rango se encuentra la concentración de enzima óptima para el ensayo . El ensayo cinético consiste básicamente en medir la velocidad de la reacción de manera continua. La ventaja fundamental de este método con respecto al análisis de tiempo fijo es que nos permite la observación de la linealidad o no linealidad de la respuesta en función del tiempo, para lo cual un equipo con graficador integrado es indispensable.

La principal prueba para la medición de  $V_o$  consiste en un análisis gráfico y continuo de la velocidad de la reacción para observar si ésta es función lineal de la concentración de la enzima; este análisis deberá ser aplicado a todos los ensayos en donde se utilice la velocidad de la reacción para medir la concentración de la enzima (Clark, J.M. et al 1977).

PROCEDIMIENTO

Para determinar las condiciones de medición se efectuó la cuantificación de la actividad enzimática en función de:

- A) Concentración de glucosa-6-fosfato
- B) Concentración de  $\text{NADP}^+$
- C) Cantidad de proteína

bajo los siguientes cuadros de reacción:

1.- CUADRO DE REACCION CORRESPONDIENTE A LA GRAFICA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA - CONCENTRACION DE GLUCOSA-6-FOSFATO (Fig. 5 ).

	VOLUMEN	CONCENTRACION
Amortiguador de Medición (AM) (glicina 0.04M pH 7.5)	0.5 ml	0.0060M
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1M)	0.3 ml	0.01 M
Glucosa-6-fosfato 0.02M	Variable	Variable
Extracto enzimático	0.5 ml	
	Constante	
Agua, c.b.p.	3.0 ml	
$\text{NADP}^+$ 1250 $\mu$ M	0.3 ml	125 $\mu$ M
	Constante	
Volumen final	3.0 ml	

CELDA: de cuarzo de 1 cm de paso de luz

TEMPERATURA: 30°C

LECTURAS: 1 lectura/min

VELOCIDAD DEL PAPEL: 1 min/cm

TIEMPO DE LECTURA: 5 minutos para cada determinación

LECTURA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: Esta se obtuvo mediante el cálculo de la diferencia entre las pendientes (cambio de absorción a 340 nm en 5 minutos) entre el problema y el blanco.

Todos los reactivos se mantuvieron a 30°C con excepción del extracto enzimático, que se mantuvo sobre hielo. La reacción se inició con la adición de NADP<sup>+</sup>, se preparó un blanco de reacción, al cual se le adicionó glucosa-6-fosfato.

FUENTE DE LA ENZIMA:

0.5g de embriones (escutellum + eje embrionario) de maíz en estado seco (germen 860 - 1373 - pool dent) fueron homogeneizados utilizando el procedimiento descrito para la obtención del extracto enzimático; previo a la centrifugación se aforó a 20 ml con la solución (AH); después de la centrifugación se diluyó 1:5 con la solución (AM), esta dilución constituyó el Extracto Enzimático utilizado en el Cuadro de Reacción anterior.



QUIMICA  
D. E. PG.



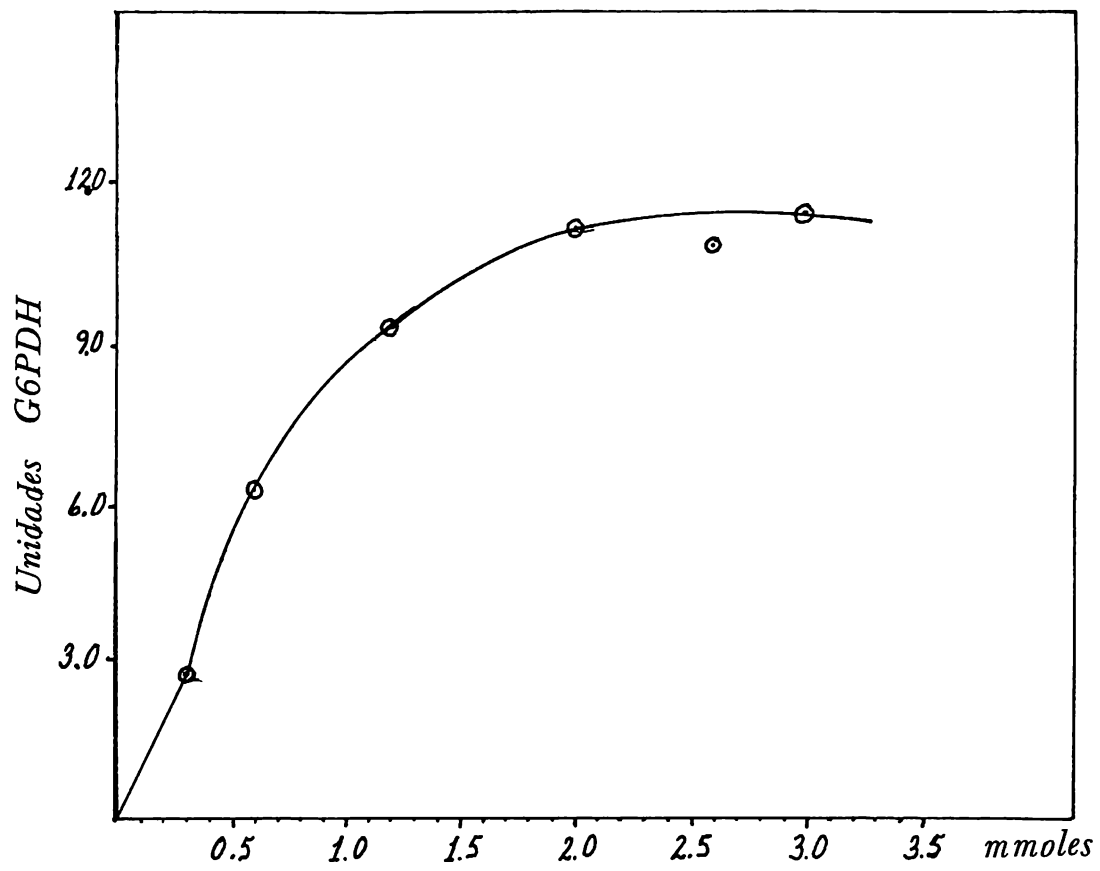


Figura.5.-Actividad enzimática a diferentes concentraciones de Glucosa-6-fosfato.

2.- CUADRO DE REACCION CORRESPONDIENTE A LA GRAFICA ACTIVIDAD ENZIMATICA  
- CONCENTRACION DE NADP<sup>+</sup> (Fig. No. 6 ).

	VOLUMEN	CONCENTRACION
Amortiguador de Medición (AM) (glicina 0.04M pH 7.5)	0.5 ml	0.006M
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0.1M	0.3 ml	0.01M
Glucosa-6-fosfato 0.02M	0.3 ml	2 000 μM
	constante	constante
Extracto Enzimático	0.5 ml	
Agua, c.b.p. 3 ml	Variable	
NADP <sup>+</sup> 1250 μM	Variable	Variable
Volumen final	3.0 ml	

CELIDAS: cuarzo de 1 cm de paso de luz

TEMPERATURA: 30°C

LECTURAS: 1 lectura/min

VELOCIDAD DEL PAPEL: 1 min/cm

TIEMPO DE LECTURA: 5 minutos para cada determinación.

LECTURA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA: Esta se obtuvo mediante el cálculo de la diferencia entre las pendientes (cambio de absorción a 340 nm en 5 minutos) entre el problema y el blanco.

Todos los reactivos se mantuvieron a 30°C con excepción del Extracto Enzimático, que se mantuvo sobre hielo. La reacción se inició con la

adición de  $\text{NADP}^+$ , se preparó un blanco al cual no se le adicionó glucosa -6-fosfato.

FUENTE DE LA ENZIMA:

0.5g de embriones (escutellum + eje embrionario) de maíz en estado seco (germen 860 - 1373- pool dent) fueron homogeneizados utilizando el procedimiento descrito para la obtención del extracto enzimático. Previo a la centrifugación se aforó a 20 ml con la solución (AH) y al final de la misma se diluyó 1:5 con la solución (AM). Esta dilución final constituyó el Extracto Enzimático utilizado en el cuadro de reacción anterior.

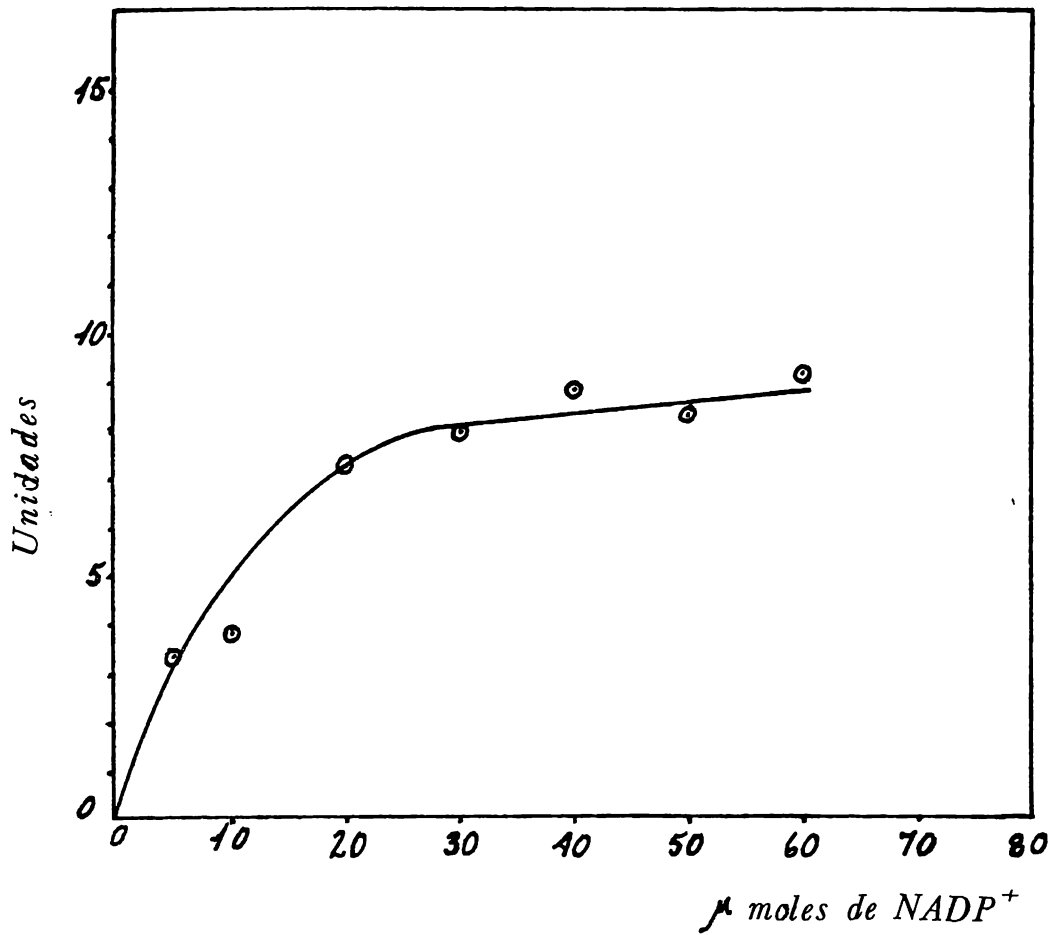


Figura.6.-Atividade enzimática a diferentes concentrações de NADP<sup>+</sup>.

3.- CUADRO DE REACCION CORRESPONDIENTE A LA GRAFICA ACTIVIDAD ENZIMATICA  
 → CANTIDAD DE PROTEINA (Fig, No. 7 ).

	VOLUMEN	CONCENTRACION
Amortiguador de Medición (AM) (glicina 0.04M pH 7.5)	0.5 ml	0.006M
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0.1M	0.3 ml	0.01M
Glucosa-6-fosfato 0.02M	0.3 ml	2000 μM
	Constante	Constante
Extracto Enzimático	Variable	Variable
Agua, c.b.p. 3.0 ml	Variable	
NADP <sup>+</sup> 1250 μM	0.3 ml	125 μM
Volumen final	3.0 ml	

CELDA: cuarzo 1 cm de paso de luz

TEMPERATURA: 30°C

LECTURAS: 1 lectura/min

VELOCIDAD DEL PAPEL: 1' min/cm

TIEMPO DE LECTURA POR DETERMINACION: 5 minutos

LECTURA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA: Esta se obtuvo mediante el cálculo de la diferencia entre las pendientes (cambio de absorción a 340 nm en 5 minutos) entre el problema y el blanco.

† Todos los reactivos se mantuvieron a 30°C con excepción del extracto enzimático que se mantuvo sobre hielo. La reacción se inició con la

adición de  $\text{NADP}^+$ ; se preparó un blanco al cual no se le adicionó glucosa -6-fosfato.

FUENTE DE ENZIMA:

0.2g de ejes embrionarios de maíz en estado seco (germen 860-1373-pool-dent) fueron homogeneizados utilizando el procedimiento descrito para la obtención del extracto.

Aforo total del Extracto Enzimático: 10 ml

CONDICIONES DE MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA DE LOS DIFERENTES TEJIDOS DE LA SEMILLA DE MAIZ.

De los resultados obtenidos en los análisis efectuados para el establecimiento de los parámetros de reacción de la actividad enzimática se seleccionaron los valores considerados como óptimos, mismos que se resumen en el siguiente cuadro:

CUADRO DE REACCION CORRESPONDIENTE A LA MEDICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

	VOLUMEN	CONCENTRACION
Amortiguador de Medición (AM) (glicina 0.04M pH 7.5)	0.5 ml	0.006M
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 0.1M	0.3 ml	0.01M
Glucosa-6-fosfato 0.02M	0.3 ml	2000 μM
Extracto Enzimático	0.3 ml	
Agua	1.0 ml	
NADP <sup>+</sup> 1250 μM	0.3 ml	125 μM

Conservándose las mismas condiciones y procedimientos descritos durante la optimización de los parámetros de medición; estas condiciones permiten obtener linealidad en la actividad enzimática con respecto a la concentración de enzima hasta una cantidad equivalente a 600 μg de proteína (Fig. No. 7 ).

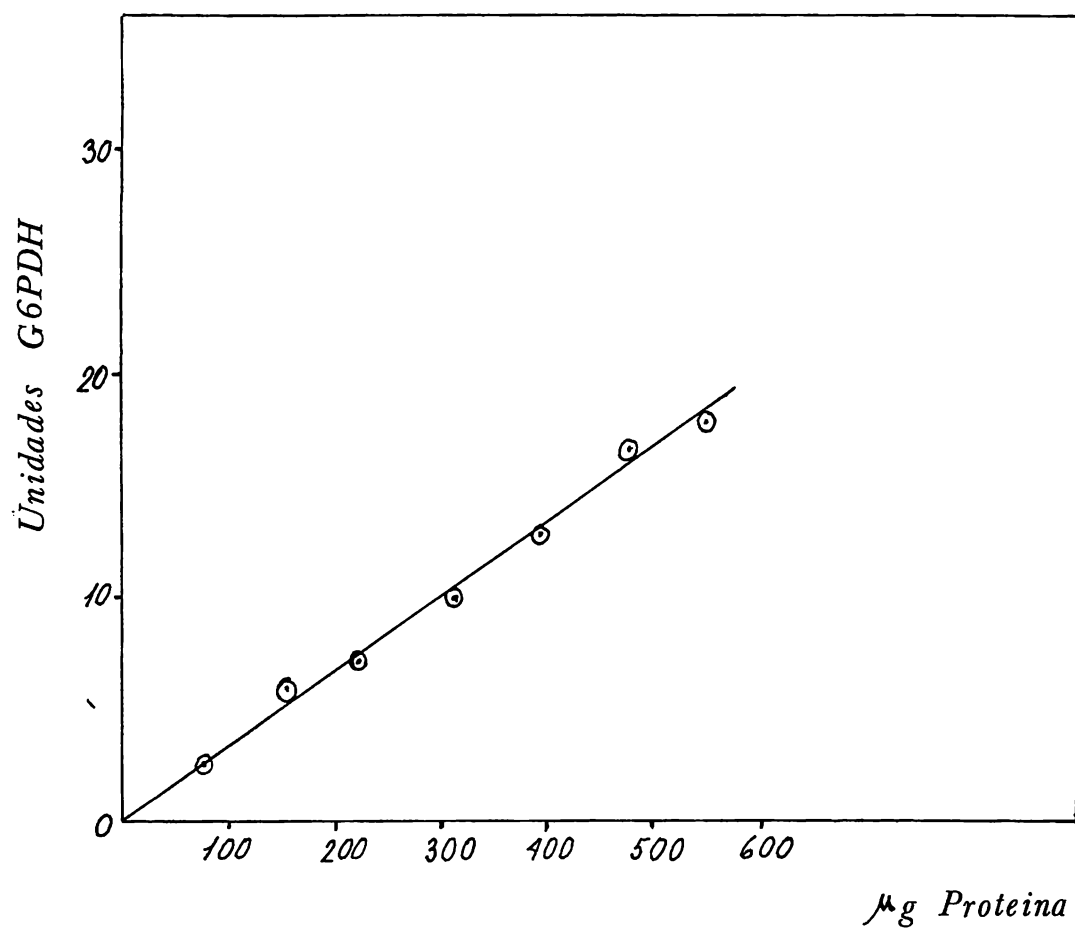


Figura.7.-Actividad enzimática a diferentes concentraciones de Protefna.



PREPARACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO DE LOS DIFERENTES TEJIDOS DE LA SEMI-  
LLA DE MAIZ PARA LA CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-FOSFA-  
TO DESHIDROGENASA DURANTE LA GERMINACION Y MADURACION DEL GRANO.

REACTIVOS:

1.- Amortiguador para Homogeneización (AH)

50 mM KCl

10 mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

100 mM Glicina

30 mM Mercaptoetanol (adicionar al momento de la homogeneización).

Ajustar el pH a 7.5 con HCl.

EQUIPO:

1.- Homogeneizador "Politron".

2.- Ultracentrifuga "Spinco" Modelo L50

3.- Rotor Ti 40

METODO:

En una cápsula de procelana colocada sobre un baño de hielo y auxiliándose con un bisturí, se separan los componentes del embrión de maíz: eje embrionario y escutellum (20 semillas por determinación), se homogeneizan por separado utilizando un volumen de 5 ml de la solución (AH) a velocidad máxima (escala 10) en el homogeneizador "Politron" por 10 segundos en frío. Se afora con solución (AH) a 10 ml y se centrifuga a 22 000 rpm du-

rante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante diluido 1:10 con la solución (AM) constituye el Extracto Enzimático. Por la labilidad intrínseca de la enzima (Levy, H.R. 1979), la determinación de su actividad deberá efectuarse inmediatamente.

**CUANTIFICACION DE PROTEINAS (Lowry, O.H. 1951).****REACTIVOS:**

- A: Carbonato de sodio al 2.0% en NaOH 0.1N
- B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1.0%
- C: Tartrato de sodio y potasio al 2.0%
- D: Solución protéica de referencia: albúmina sérica bovina 1 000  $\mu\text{g/ml}$
- E: Volúmenes iguales de las soluciones B y C.
- F: Para cada 50 ml de la sol. A agregar 1 ml de la sol. E
- G: Dilución de 3 ml de reactivo de Folín-Ciocaltean (Merck) con 4.5 ml de agua.

**EQUIPO:**

- 1.- Centrífuga clínica
- 2.- Espectrofotómetro Carl Zeiss PMQ II
- 3.- Celdas de cuarzo de 1 cm de luz

**METODO.-****1.- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS:**

Para eliminar los componentes del extracto enzimático que interfieren en la determinación ( $\beta$ -mercaptoetanol, compuestos fenólicos, etc.), se precipitaron las proteínas mediante la adición de ácido tricloroacético al 10% (concentración final), conservándose durante 24 horas a  $-5^\circ\text{C}$  y separándose por centrifugación a 2 500 rpm durante 10 minutos en la centrífuga clínica. Se resuspendieron con 1.0 ml de solución de glicina 0.04M pH 13.

**2.- DETERMINACION DE LAS PROTEINAS.**

A 0.1 ml del reactivo D (referencia) o de la solución de proteínas de las muestras obtenidas mediante el procedimiento anteriormente descrito, se le adicionaron 0.4 ml de agua, 1.0 ml de NaOH 0.1N y 4 ml del reactivo F; 10 minutos después se le agregan 0.4 ml del reactivo G, dejándose en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente leer su absorción a 750 nm. El resultado se interpola en la gráfica de la figura No. 8.

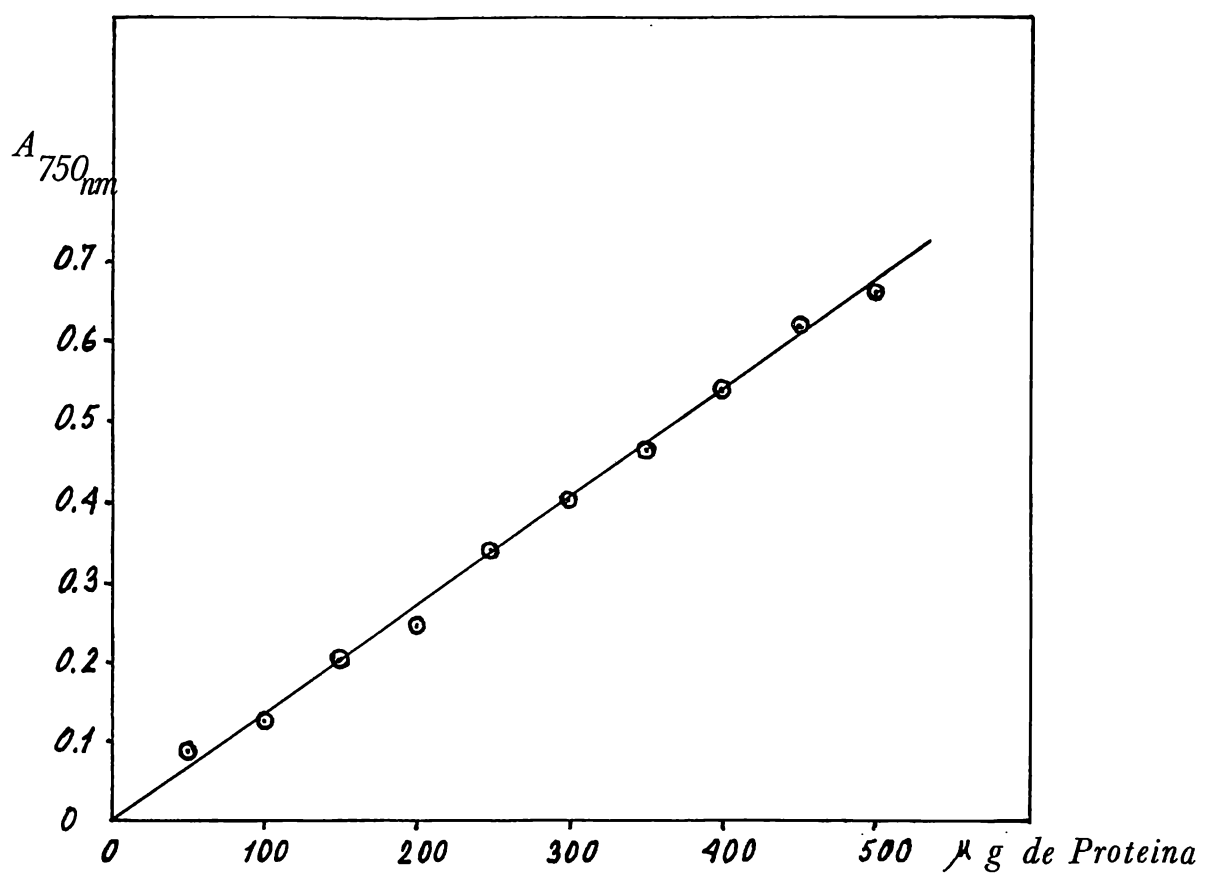


Figura.8.—Curva de referencia para la cuantificación de proteínas.

5.2.- DETERMINACION DE LA RELACION  $C_6/C_1$  DURANTE LA IMBIBICION EN DIFERENTES TEJIDOS DE LA SEMILLA DE MAIZ. (Kanamori, I. et al 1979).

FUNDAMENTO:

En semillas, una estimación aproximada de las actividades relativas de las vías glicolítica y de pentosas se puede obtener mediante la comparación de su capacidad de degradar glucosa-6- $^{14}C$  y glucosa-1- $^{14}C$ .

Esta técnica consiste esencialmente en la captación y cuantificación del  $^{14}CO_2$  que se libera de las posiciones C-1 y C-6 de la molécula de glucosa, este resultado expresado en forma de relación ( $C_6/C_1$ ), proporciona una medida de la actividad proporcional de ambas vías metabólicas: una relación alta indica una vía glicolítica activa, mientras que una relación baja está indicando que la vía de las pentosas es la más activa (Bewley, J.D. 1978). No obstante que existen algunos factores que limitan la aplicación de la relación anterior, entre éstos se encuentran principalmente: la cantidad de glucosa que es utilizada para la síntesis de oligo y polisacáridos, el efecto de recirculación en la vía de las pentosas (Fig. No.

2) y la proporción de triosas que son movilizadas para la síntesis de ácidos orgánicos, aminoácidos, etc. (AP Rees, T. 1980). Esta relación es considerada válida para medir la proporcionalidad en la degradación de carbohidratos de las vías glicolítica y de pentosas (Bewley, J.D. 1978). La cuantificación de esta relación durante la ruptura de la latencia en semillas de Avena fatua (Simmonds, J.A. et al 1971) y cebada (Roberts, E.

H. 1973) mostró una baja relación  $C_6/C_1$ , indicando que la vía de las pentosas en estos granos próximos a germinar está más activa que la vía glicolítica (Bewley, J.D. 1979).

**REACTIVOS:**

1.- D-(1- $^{14}C$ ) Glucosa.

Sol. acuosa en etanol al 3.0%

61.1 mci/mmol

250  $\mu$ ci (1.85 MBq)

The Radiochemical Centre.

Amersham, England.

2.- D-(6- $^{14}C$ ) Glucosa.

Sol. acuosa en etanol al 3.0%

56.4 mci/mmol

250  $\mu$ ci (1.85 MBq)

The Radiochemical Centre

Amersham, England.

3.- Líquido de Bray.

A) Composición:

4 g de PPO (2,5- Difeniloxizol)

0.2 g de POPOP (Dimetil-2,2-fenilen-bis-(5-feniloxizol), dimetil

60 g naftaleno

20 ml de etilenglicol

100 ml de metanol

Llevar a un litro con 1,4 Dioxano.

B) Preparación:

Inicialmente se adiciona al naftaleno aproximadamente 250 ml de 1,4 Dioxano y en orden sucesivo los demás reactivos. No adicionar más 1,4 dioxano hasta disolución completa de los componentes de la mezcla.

4.- Amortiguador de Imbibición (AI):

Tris (Hidroximetil)-Aminometano	50 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10 mM
KCl	50 mM
Sacarosa	2%
pH	7.6

5.- KOH al 30%

6.- Etanol al 80%

7.- Papel filtro Wathman No. 42

EQUIPO:

1.- Respirómetro de Warburg .

2.- Contador de Centelleo Líquido LS9000 Microprocessor Controlled Beckman.

3.- Viales de vidrio de 10 ml de capacidad para contador de centelleo.



DETERMINACION DE LA RELACION  $C_6/C_1$  EN EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ.

PULSO DE 0 - 1 HORAS:

METODOLOGIA

Auxiliándose con un bisturí se separa el eje embrionario de las semillas secas de maíz, se pesa una población de 20 y se colocan en un matraz de Warburg de 15 ml de capacidad, adicionándoseles .7 ml de la solución (AI) y una cantidad de cloranfenicol equivalente a una concentración final de 10 g/ml, más 5  $\mu$ l de la glucosa marcada respectiva ( $1.7 \times 10^6$  cpm); se instalan 3 abanicos de papel Watman No. 42 en el pozo central del matraz, preincubándose sobre un baño de hielo por 30 minutos, al final de este período se le adiciona a los abanicos de papel 0.3 ml de KOH al 30% y se instala el matraz en el barómetro colocándose el tapón en su brazo lateral (cerrándose el sistema). A partir de este momento se incuban a 30°C por 1 hora con agitación (aproximadamente 60 oscilaciones por minuto), al término de este período se sacan los abanicos de papel del pozo central y se colocan dentro de un frasco vial de vidrio conteniendo 10 ml del líquido de Bray y se procede a contar la radioactividad captada como  $K_2CO_3$ . Se lava el tejido con 100 ml de agua y se coloca en 10 ml de etanol al 80% conservándose a -10°C para la extracción de sus carbohidratos solubles.

DETERMINACION DE LA RELACION  $C_6/C_1$  EN EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ.

PULSO DE 5 - 6 HORAS.

METODOLOGIA.

El procedimiento para este lapso de imbibición fue el mismo que se empleo - en la evaluación de la relación  $C_6/C_1$  durante el pulso de 0 - 1 horas, con las siguientes modificaciones inherentes a este periodo:

El tejido se incubó con agitación por 5 horas en el sistema de warburg a - bierto a la atmósfera (sin el tapón en el brazo lateral del matraz), la adición de la glucosa marcada respectiva al medio de imbibición y el KOH al - 30% sobre el papel filtro del pozo central se efectuó al final de este pe - riodo; inmediatamente después se cierra el sistema colocando el tapón en el - brazo lateral del matraz y se incuba por espacio de una hora mas.

Para la evaluación de la radiactividad, lavado y conservación del tejido, se - procedió de manera similar al experimento efectuado para evaluar la relación -  $C_6/C_1$  durante el pulso de 0 - 1 horas.

DETERMINACION DE LA RELACION  $C_6/C_1$  EN EMBRIONES DE MAIZ.

FULSO DE 0 - 1 HORAS.

FULSO DE 5 - 6 HORAS.

METODOLOGIA:

Unicamente se efectuaron dos modificaciones en el procedimiento para determinar esta relación con respecto al utilizado en los mismos periodos en ejes embrionarios:

1.-Número de embriones (Escutellum + eje embrionario) aislados por determinación: 13. Esta población distribuida en el fondo del matraz, permite que el tejido siempre se mantenga en contacto con la solución de imbibición, evitándose superposiciones de la muestra.

2.-Volúmen de amortiguador de imbibición: 1.3 ml .

Previo a la extracción de los carbohidratos solubles de estas muestras, se separaron los tejidos y se les denominó respectivamente: Eje embrionario unido y Escutellum unido .

DETERMINACION DE LA RELACION  $C_6/C_1$  EN ESCUTELLUM DE MAIZ.

PULSO DE 0 - 1 HORAS.

PULSO DE 5 - 6 HORAS.

METODOLOGIA:

Unicamente se efectuaron dos modificaciones en el procedimiento para de -  
terminar esta relación con respecto al utilizado en los mismos periodos -  
en ejes embrionarios:

1.-Número de escutellum aislados por determinación: 13 .Esta población dis-  
tribuida en el fondo del matraz,permite que el tejido siempre se mantenga -  
en contacto con la solución de imbibición,evitandose superposiciones de -  
las muestras.

2.-Volúmen de amortiguador de imbibición: 1.3 ml .

5.3. EFEECTO DE ACIDO GIBERELICO, CINETINA Y ACTINOMICINA-D SOBRE LA ACTIVIDAD -  
DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENSA DURANTE LA GERMINACION EN EMBRIO -  
NES AISLADOS DE MAIZ.

REACTIVOS:

1.-Solución Nutritiva. (SN)

Sacarina	2%
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10 mM
βmercaptoetanol	5 mM
pH	7.5
Estreptomina	10 g/ml

2.-Acido giberélico.

3.-Cinetina.

4.-Actinomicina-D.

5.-Los necesarios para la determinación de la actividad enzimática.

MATERIAL BIOLÓGICO: Germen 860-1373 peel dent.

MATERIAL Y EQUIPO:

Todo el necesario para la obtención del extracto enzimático y la cuantificación de la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

**PROCEDIMIENTO:**

Utilizando matraces erlenmeyer de 10 ml se incuban a 37°C por 20 horas, - con agitación (60 oscilaciones / min) y en la oscuridad 0.4 g de embriones- añadiendoles: 1.0 ml de la solución nutritiva y las cantidades respectivas - de hormona y antibiótico:

Acido giberélico	63 g/ml
Cinetina	40 g/ml
Actinomicina-D	294 g/ml
Control	0.7 ml de la sol.nutritiva.

Se tapan con algodón y al final del periodo de incubación se lava el tejido con la solución (AH) y se procede a la obtención del extracto para cuantificar la actividad enzimática.

1.4.- EFECTO DE  $\alpha$ -AMANITINA Y CICLOHEXIMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA DURANTE LA GERMINACIÓN EN EJES EMBRIONARIOS AISLADOS DE MAIZ.

REACTIVOS:

Los utilizados para la determinación del efecto de hormonas sobre la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y:

- 1.- amanitina.
- 2.-Cicloheximida.
- 3.-Los necesarios para la determinación de la actividad enzimática.

MATERIAL BIOLÓGICO:

TLAXCALA VS 22E (Chapingo 1979)

MATERIAL Y EQUIPO:

Todo el necesario para la obtención del extracto y la cuantificación de la actividad enzimática.

PROCEDIMIENTO:

Utilizando matraces erlenmeyer de 10 ml, se incubó a 37°C por diferentes ---

tiempos de germinación (6-12 horas), con agitación (60 oscilaciones/min) - y en la oscuridad 20 ejes embrionarios añadiéndoles: 1.0 ml de la solución nutritiva y las cantidades respectivas de antibióticos:

Cicloheximida	10 - 100 g/ml
$\alpha$ -amanitina	10 g/ml
Control	1.7 ml
Vol.final =	1.7 ml

infiltrándose al vacío por 60 segundos, se tapan con algodón y al final del periodo de incubación respectivo se lava el tejido con solución (AH) y se procede a la obtención del extracto para la cuantificación de la actividad enzimática.



5.5.- ESTIMACION DE LA PROPORCION DE RADIATIVIDAD INCORPORADA EN CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN LOS TEJIDOS A LOS QUE SE LES DETERMINO LA RELACION  $C_6/C_1$ .

FUNDAMENTO:

Uno de los mejores procedimientos para la medición de la actividad de la vía de las pentosas en plantas, consiste en la aplicación de glucosa-1- $^{14}C$ , -2- $^{14}C$ , y -3- $^{14}C$  y determinar posteriormente la distribución de marca en hexosas-fosfato y pentosas-fosfato; esto en función de las dificultades expresadas anteriormente para la estimación de las actividades relativas de las vías glicolítica y de pentosas basadas exclusivamente en la medición de la relación  $C_6/C_1$  (Ap Rees, T. 1980).

Dado que este método presenta enormes dificultades técnicas (la cantidad de los compuestos citados es muy pequeña); una de las soluciones es la determinación de la distribución de marca radiactiva en compuestos relacionados. (Ap Rees, T. 1980)

METODOLOGIA:

A).- EXTRACCION DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES: (Ortega-D.M.L. et al 1979).

REACTIVOS:

- 1.-Etanol absoluto.
- 2.-Etanol 80% .

- 3.-Tungstato de Sodio 10%.
- 4.-Acido sulfúrico 0.66 N.
- 5.-Bicarbonato de sodio.

#### MATERIAL Y EQUIPO.

- 1.-Equipo Soxhlet 250 ml.
- 2.-Rotavapor.
- 3.-Papel Whatman No. 1 .
- 4.-Ultracentrifuga "Spinco" Modelo L 50 .
- 5.-Rotor T1 40 .

#### PROCEDIMIENTO.

El tejido (conservado en etanol al 80% y a  $-10^{\circ}\text{C}$ ) se somete a ebullición - por 10 minutos, al final de este periodo se filtra y se conserva el filtra - do (extracto # 1); posteriormente se procede a macerrar el tejido en un mor - tero, al término de esta operación se filtra conservandose el filtrado (ex - tracto # 2 ); el macerado se coloca en un cartucho de papel whatman No. 1 y - después de colocarlo dentro del equipo soxhlet se somete a reflujo por espa - cio de 6 horas, el concentrado (extracto # 3) se reúne con los extractos - # 1 y # 2 y se concentran hasta un volumen de  $\pm 10$  ml en un rotavapor a  $60 - 70^{\circ}\text{C}$ .

Para cada 10 ml del extracto concentrado anterior se le adicionan: 2.0 ml de tungstato de sodio al 10% y 2.0 ml de ácido sulfúrico 0.66 N y se mantiene en reposo a 4°C por 12 horas; se neutraliza con bicarbonato de sodio y se centrifuga a 20 000 rpm por espacio de 20 minutos, el extracto final se conserva a -20°C.

**.6.- CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL EN PLACA FINA DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES.**

(Lewis, B.A. et al 1969).

**REACTIVOS:**

**CARBOHIDRATOS DE REFERENCIA.**

1.-Ribosa

2.-Glucosa

3.-Sacarosa

4.-Fructosa

5.-Manosa

6.-Maltosa

---

7.-Eluyente para la primera dimensión:Acetona:Agua (90:10)

8.-Eluyente para la segunda dimensión:Acetona:Agua:Cloroformo:Metanol -  
(75:5:10:10).

9.-Cromatoplaacas de silicagel 60 (Artículo 5721 Merck), dimensiones:20 x 20 -  
centímetros y 0.22 mm de espesor de la capa de absorbente.

10.-Revelador: "Ftalato de anilina"

**Preparación:**

En un embudo de separación se adicionan 200 ml de n-butanol y 40 ml de agua -  
se agita y una vez decantada la fase acuosa se adicionan 3.2 g de ácido -

ftálico y 0.9 ml de anilina.

MATERIAL Y EQUIPO:

- 1.-Microjeringa de 50  $\mu$ l .
- 2.-Cámara de vidrio para cromatografía en placa fina (25 x 25 x 15 cm ).

PROCEDIMIENTO:

PRIMERA DIMENSIÓN:

En una cámara de vidrio saturada por espacio de 12 horas con el eluyente -  
respectivo:Acetona-agua (90-10),se coloca una placa de silicagel 60 pre -  
viamente activada por 5 min a 100°C a la cual se le ha aplicado en un pun -  
to cuyas coordenadas son:2.0-2.5 cm,tomando como origen el vértice izquier -  
do de la placa un volumen de 100  $\mu$ l de la mezcla de carbohidratos de refe -  
rencia (10  $\mu$ g cada uno).Se permite el desarrollo de la cromatografía hasta -  
que el frente del eluyente alcance una distancia de 3 mm abajo del extremo -  
superior.

SEGUNDA DIMENSIÓN.-

En una cámara de vidrio saturada por espacio de 12 horas con el eluyente -  
respectivo:acetona-agua-cloroformo-metanol (75:5:10:10),se coloca la placa -  
anteriormente desarrollada haciendola girar 90° hacia la izquierda.Se per -  
mite el desarrollo de la cromatografía hasta que el frente del eluyente --

alcanza una distancia de 3 mm abajo del extremo superior de la placa. Se seca al aire y se aplica el revelador, activando la reacción a 100°C por 10 minutos.

#### UBICACION DE LOS CARBOHIDRATOS DE REFERENCIA:

Los carbohidratos aislados y revelados mediante el procedimiento anterior, se localizan sobre un sistema de coordenadas cartesianas. (fotografía # 1)

#### CUANTIFICACION DE LA MARCA RADIATIVA INCORPORADA A CARBOHIDRATOS SOLUBLES.

##### REACTIVOS:

1.-Líquido de Bray. (Preparado de manera similar al utilizado en la técnica de cuantificación de la relación  $C_6/C_1$ . pág. 94 ).

##### MATERIAL Y EQUIPO:

- 1.-Cromatoplasmas de sílicagel 60 (Artículo 5721 Merck).
- 2.-Microjeringa de 50  $\mu$ l.
- 3.-Cámara de vidrio para cromatografía.
- 4.-Bisturí.
- 5.-Contador de centelleo líquido "Packard" modelo 3255 Tri-Carb.



**PROCEDIMIENTO:**

Sobre el extremo izquierdo de una placa de sílica gel 60 se aplican en un punto cuyas coordenadas son: 2.0-2.5 cm  $100 \mu\text{l}$  de la muestra de carbohidratos solubles (obtenidos a partir de los tejidos a los que se les determinó la relación  $C_6/C_1$  según el método descrito en las páginas: 104-106 ). Se efectúa el desarrollo de la cromatografía en las dos dimensiones descritas y al final de la misma se localizan los carbohidratos solubles mediante su ubicación en el sistema de coordenadas cartesianas; se transfiere a un frasco vial de vidrio el gel ubicado en una área cuyo radio es de 1.5 cm - alrededor del punto de localización del carbohidrato respectivo, se le adicionan 10 ml de líquido de Bray y se procede a cuantificar la radiactividad incorporada.



**7.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-  
FOSFATO DESHIDROGENASA .**

**REACTIVOS:**

Los necesarios para la determinación de la actividad de glucosa-6-fosfato -  
deshidrogenasa.

**MATERIAL BIOLÓGICO:** Tlaxcala VS 22E .

**MATERIAL Y EQUIPO:**

El utilizado para la obtención del extracto y la cuantificación de la acti -  
vidad enzimática.

**PROCEDIMIENTO:**

A).-EXTRACTO ENZIMÁTICO: Se homogeneizaron 0.32 g de ejes embrionarios, uti -  
lizando el procedimiento descrito con anterioridad. Pág. 88

Para la evaluación de este efecto, se utilizó el extracto sin efectuar la -  
dilución 1:10 con la solución (AM) que se menciona en la elaboración del -  
extracto para la determinación de la actividad enzimática durante la germi -

nación. Pág. 89

**B).-CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.-**

La determinación de la actividad enzimática se efectuó bajo las condiciones óptimas determinadas con anterioridad. Pág. 86      contra volúmenes crecientes de extracto enzimático. {

- 8.- CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL DE LAS PROTEINAS QUE PRECIPITAN CON SULFATO DE AMONIO AL 70% DE EJE EMBRIONARIO SECO Y DETERMINACION DE SU CAPACIDAD DE INHIBIR A LA GLUCOSA -6-POSFATO DESHIDROGENASA DE ERITROCITO-HUMANO. (Determan, H. 1969). (Fig. 17 ).

REACTIVOS.

- 1.-Los utilizados para la determinación de la actividad de la glucosa-6 - fosfato deshidrogenasa .:
- 2.-Sephadex G-200
- 3.-Sulfato de amonio.
- 4.-Solución salina isotónica.
- 5.-Eritrocitos humanos.
- 6.-Azul de dextrano-2000.

MATERIAL Y EQUIPO:

- 1.-El utilizado para la obtención del extracto y la cuantificación de la actividad enzimática .:
- 1.-Homogeneizador Potter-Elvehjem (teflón-vidrio).
- 2.-Colector de fracciones "LKB".
- 3.-Columna "Pharmacia" (1.0 x 0.02 m).

MATERIAL BIOLÓGICO:

Tlaxcala VS 22 E (Chapingo 1979).

**PROCEDIMIENTO:**

Al extracto enzimático (40 ml) obtenido de la homogeneización de 1.0 g de eje embrionario seco se le inactiva la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa mediante tratamientos alternos de congelación ( $-45^{\circ}\text{C}$ )-descongelación a temperatura ambiente (operación que se repite 4 veces), se ajusta al 70% con sulfato de amonio; el precipitado proteico obtenido después de centrifugar a 22 000 rpm por 10 minutos se resuspende con 3.0 ml de la solución (AM) y se aplica a una columna de sephadex G-200 (equilibrada con la solución AM) - se colectaron fracciones de 2.0 ml y se les determinó la capacidad de inhibir a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de eritrocito humano, extracto que se obtuvo después de lavarles 4 veces con solución salina isotónica y lissarlos con la solución (AM) auxiliándose con un homogeneizador tipo "Petter-Elvehjem".

- .9.- GRADIENTE DE SACAROSA : 5-20% DE LAS FRACCIONES DE LA COLUMNA DE FILTRACION EN GEL QUE MOSTRARON CAPACIDAD INHIBITORIA CONTRA LA G6FDH DE ERITROCITO HUMANO. (FIG. 18 ) .**

**REACTIVOS:**

- 1.-Los utilizados para la determinación de la actividad de la G6FDH .
- 2.-Extracte enzimático de maíz:Tlaxcala VS 22E (Chapingo 1979) de 6 horas de germinación.
- 3.-Sephadex G-10.
- 4.-Sacarosa para gradientes.
- 5.-Marcadores proteicos de PM:Albúmina sérica bovina, Mieglobina e Inhibidor de tripsina de soya.

**MATERIAL Y EQUIPO:**

- 1.-El utilizado para la obtención del extracte enzimático y la cuantificación de la actividad de la G6FDH.
- 2.-Ultracentrífuga "Beckman" Modelo L-75.
- 3.-Rotor SW 40.
- 4.-Instrumente formador de gradientes.
- 5.-Bomba peristáltica "Buchrer".
- 6.-Tubes para centrifuga de Nitrate de celulosa.

PROCEDIMIENTO:

Las fracciones proteicas colectadas de la columna de filtración en gel - (Sephadex G-200) que mostraron capacidad de inhibir a la G6FDH de eritrocite humano, se concentraron hasta un volumen de 3.0 ml mediante la adición de sephadex G-10. Posteriormente se colocan 0.5 ml sobre la parte superior de un gradiente de sacarosa 5-20% (triplicado) y se somete a centrifugación por espacio de 18 horas (Rotor SW 40, 38 000 rpm y 4°C), al final de la misma y haciendo una punción en la parte superior del tubo, se colectaron fracciones de 1.0 ml a las que se les probó la capacidad de inhibir a la G6FDH de maiz (Tlaxcala VS 22E).

Paralelamente y en un cuarto tubo, se adicionaron 100 µg de cada una de las siguientes proteínas:

Albúmina sérica bovina (PM 68 000)

Mioglobina (PM 16 000)

Inh. de tripsina de soya (PM 20 000)

Como marcadores de peso molecular para la determinación del peso molecular aproximado de las fracciones con capacidad inhibitoria. (Fig 19 ) .

PROTEOLISIS CON TRIPSINA DE LAS FRACCIONES DEL GRADIENTE DE SACAROSA -  
5-20% QUE PRESENTARON ACTIVIDAD INHIBITORIA CONTRA LA G6PDH .

Este ensayo se efectuó en las siguientes etapas:

1.-Determinación de la actividad proteolítica de la tripsina mediante la -  
 cuantificación de los aminoácidos liberados (Russo, S.F. et al 1977), (Lee, -  
 Y.P. et al 1966).

2.-Evaluación de la capacidad del inhibidor de tripsina de soya de inhi -  
 bir a la tripsina.

Lo anterior con el propósito de adecuar el sistema de reacción en donde -  
 se llevó a cabo la degradación proteolítica de las fracciones del gradien -  
 te de sacarosa a la posterior evaluación de su capacidad inhibitoria re -  
 manente.

REACTIVOS:

1.-Los utilizados para la determinación de la actividad de la glucosa-6-  
 fosfato deshidrogenasa.

2.-Tripsina (1 mg/ml en HCl  $10^{-3}$ M)

3.-Inhibidor de tripsina de soya (1 mg/ml en HCl  $10^{-3}$ M).

4.-Amortiguador Tris-HCl 0.05M, pH 8.1 (adicionado con  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $5.57 \times 10^{-3}$ M)-

- 5.-Albúmina 0.1% en el amortiguador anterior.
- 6.-Acido glutámico:100  $\mu$ g/ml.
- 7.-Ninhidrina 2% en metil cellosolve (Reactivo A).
- 8.-Amortiguador de citratos 0.5M, pH 5.0 (adicionado con  $\text{SnCl}_2$  0.16%)
- 9.-n-propanol 5%.
- 10.-NaOH 1.0N.
- 11.-Acido tricloroacético 60%.
- 12.-NaCl 0.85%
- 13.-Benceno.
- 14.-Eritrocitos Humanos (10 ml de paquete celular).
- 15.-Fracciones:7,8,9,10 del gradiente de sacarosa 5-20% (2.31 mg/ml)
- 16.-Solución de trabajo:mezclar los reactivos A y B en proporción 1:1 .

#### MATERIAL Y EQUIPO:

- 1.-El utilizado en la obtención del extracto enzimático de eritrocitos y - en la cuantificación de la actividad de G6PDH.
- 2.-Espectrofotómetro Carl Zeiss PM Q II .
- 3.-Baño de incubación "Grant".
- 4.-Centrífuga refrigerada MSE.



**PROCEDIMIENTO:**

Los aminoácidos liberados por la acción de la tripsina en los siguientes - sistemas de reacción se cuantifican mediante la reacción de la ninhidrina - interpolando su valor en la curva de referencia de ácido glutámico (Fig ).

**SISTEMA 1.-** (Para la cuantificación de la actividad de tripsina).

Tripsina	0.3 ml
Albúmina	0.3 ml
Amortiguador Tris-HCl	2.4 ml

**SISTEMA 2.-** (Para la evaluación de la capacidad del inhibidor de tripsina - de soya de inhibir a la tripsina).

Tripsina	0.3 ml
Albúmina	0.3 ml
Inhibidor de Trip. de soya	0.3 ml
Amortiguador Tris-HCl	2.1 ml

**SISTEMA 3.-** (Blanco).

Agua	0.3 ml
Albúmina	0.3 ml
Amortiguador Tris-HCl	2.4 ml

Estos se incubaron a 30°C con agitación (60 oscilaciones/min) a diferentes tiempos, colocando previamente una capa de benceno sobre la superficie del sistema de reacción para evitar la evaporación y contaminación por microorganismos.

Los aminoácidos liberados en función del tiempo, son cuantificados tomando 0.5 ml del sobrenadante de reacción (obtenido después de precipitar las proteínas con la adición de ácido tricloroacético, ajustando la concentración final al 10% y neutralizando con NaOH 1.0 N) aplicándoles la reacción de ninhidrina, cuya secuencia es la siguiente:

- 1.-Muestra o solución de referencia.
- 2.-2.0 ml de la solución de trabajo.
- 3.-baño maría por 20 minutos.
- 4.-enfriar a temperatura ambiente.
- 5.-5.0 ml de n-propanol.
- 5.-leer su absorción a 570 nm. (Fig. 20 ).

El sistema (4) diseñado para la cuantificación de la actividad inhibitoria contra la G6PDH de las fracciones del gradiente de sacarosa después de someterlas a hidrólisis con tripsina se construyó de la siguiente forma:

Tripsina	0.3 ml
Fracciones del gradiente de sacarosa	0.3 ml
Amortiguador Tris-HCl	2.1 ml

Se incubó bajo las mismas condiciones de los sistemas anteriores, añadiéndole 0.3 ml del inhibidor de tripsina de soya en el momento de probar la capacidad inhibitoria contra la G6PDH del extracto de eritrocitos humanos (10 ml de paquete celular en 20 ml de la solución AH).

1.- COMPORTAMIENTO DEL INHIBIDOR DE LA G6FDH DURANTE LA GERMINACION.(FIG.22 )

REACTIVOS:

Los necesarios para la determinación de la actividad de G6FDH.

MATERIAL Y EQUIPO:

El utilizado para la determinación del extracto enzimático de eritrocito humano.

MATERIAL BIOLÓGICO:

Tlaxcala VS 22E (Chapingo 1979).

PROCEDIMIENTO:

Se someten a imbibición lotes de 20 semillas con 25 ml de agua, utilizando algodón como soporte en frascos "gerber" a diferentes tiempos de germinación, en la oscuridad y a 28°C. El extracto enzimático obtenido de las mismas, se congela a -20°C y descongela a temperatura ambiente (procedimiento que se repite 4 veces, para inactivar la G6FDH endógena). Posteriormente se dializó contra un volumen de 2 litros de amortiguador de medición (2 horas a 4°C) y se le determinó la capacidad de inhibir a la G6FDH de eritrocito humano.

6.-RESULTADOS .

A.- GERMINACION NORMAL

La evaluación de la actividad de la G6FDH durante la germinación efectuada en embriones aislados de la variedad : Gérmén 860-1373 pool dent (Ci - MMYT 1979) manifestó un incremento a las 6 horas de imbibición; observándose un descenso entre las 6 y las 24 horas, estabilizándose de las 24 a las 72 horas (Fig. 9 ).

Para definir la contribución de los tejidos embrionarios en este proceso, se cuantificó la actividad de la G6FDH tanto en eje embrionario como en escutellum durante la germinación en la variedad : Tlaxcala VS 22E (Chapingo 1979); en esta variedad, la actividad enzimática experimenta incrementos de 150% y de 40% a las 6 horas de imbibición en eje embrionario y escutellum respectivamente; disminuyendo la relación de actividades (escutellum/eje embrionario) de 3.3 en estado seco a 1.96 a las 6 horas de imbibición, la actividad enzimática es superior en el escutellum durante el periodo comprendido de las 0 a las 18 horas; pero su incremento es menor. A las 24 horas, se invierte la relación enzimática escutellum/eje embrionario (Figura 10 ).

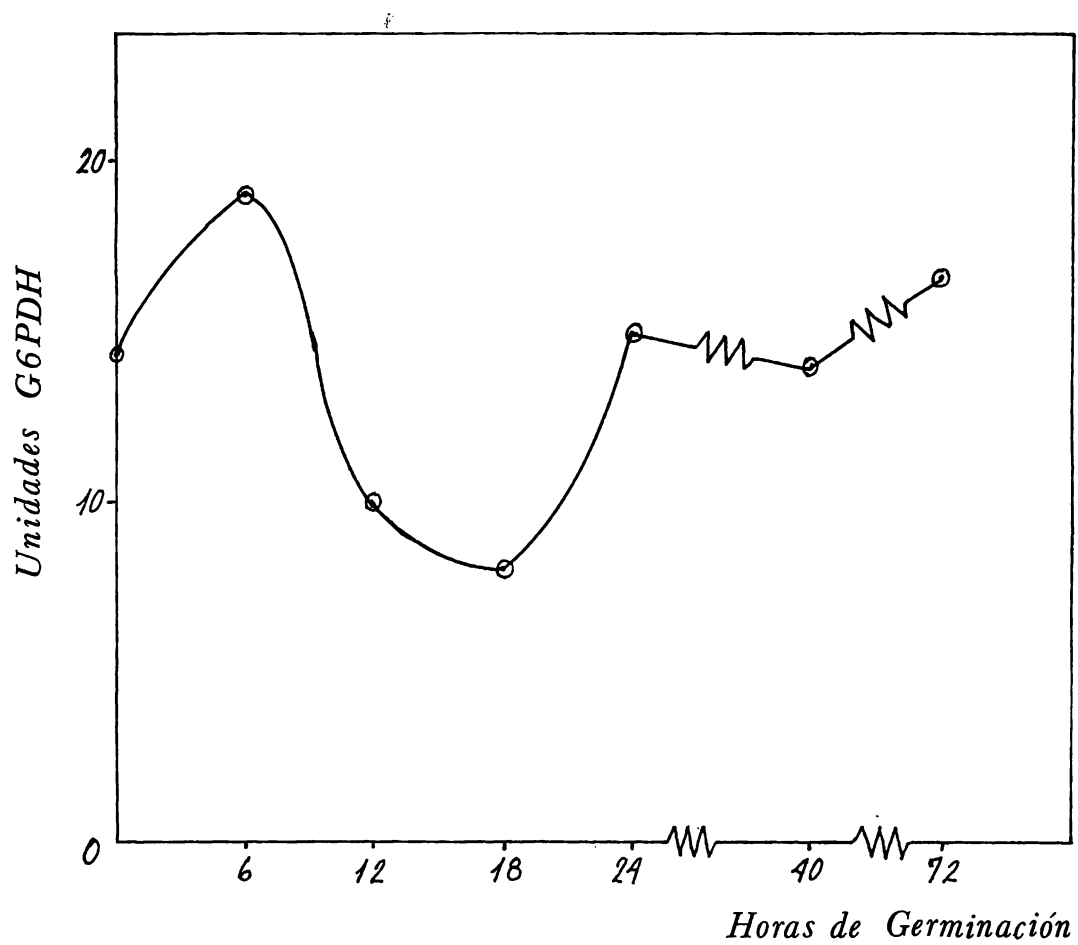


Figura 9.-Actividad enzimática a diferentes tiempos de germinación en maíz (Germen 860-1373 pool dent).



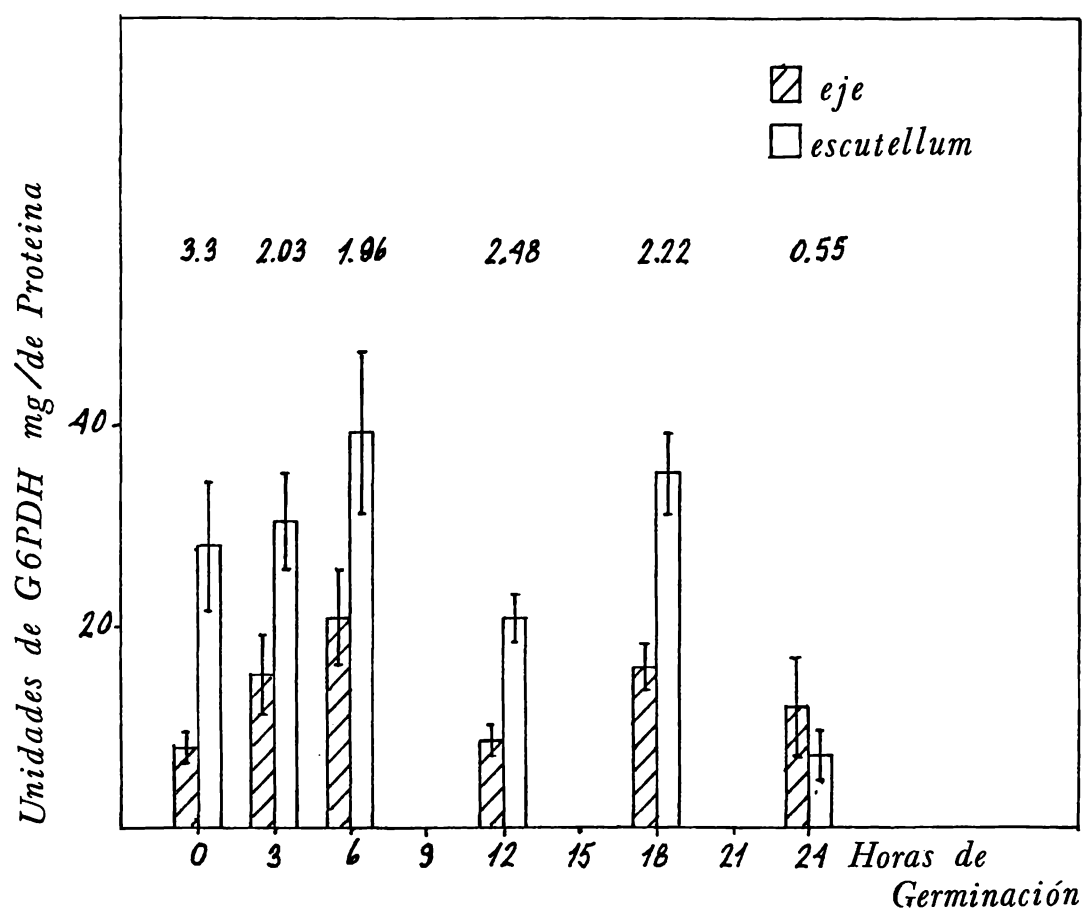


Figura 10.- Actividad enzimática a diferentes tiempos de germinación en maíz (Tlaxcala VS 22E).

Para la verificación de la actividad y el comportamiento de la actividad de la G6PDH cuantificada in vitro en la variedad Tlaxcala VS 22E (Fig. 10), se le determinó la relación  $C_6/C_1$  a dos periodos de marca radioactiva : pulso de 0-1 horas y pulso de 5-6 horas.

Estos experimentos se diseñaron y ejecutaron tanto en eje embrionario, escutellum y embrión, para analizar la influencia entre los tejidos en la expresión de este patrón .(Tablas: 4,5,6 ) .

El eje embrionario muestra una disminución de la relación  $C_6/C_1$  a las 6 horas de imbibición (pulso de 5-6 horas) en relación al pulso de 0-1 horas (Tabla.4 ), esto como consecuencia de dos eventos:

El aumento en la cantidad de  $CO_2$  que se capta de la descarboxilación de la  $1-^{14}C$ -glucosa en el pulso de 5-6 horas de imbibición, aunado a una disminución en la cantidad de  $CO_2$  producto de la descarboxilación de la  $6-^{14}C$ -glucosa en este lapso. (Tabla. 4 ).

El escutellum aislado muestra un comportamiento similar al eje embrionario : disminución de la relación  $C_6/C_1$  en el pulso de 5-6 horas en relación al valor encontrado en el pulso de 0-1 horas, esta relación disminuye a expensas de un aumento en la descarboxilación de la  $1-^{14}C$ -Glucosa, con una diferencia notable con respecto al eje embrionario : No disminuye la cantidad de  $CO_2$  que se descarboxila de la  $6-^{14}C$ -Glucosa en el -

pulso de 5-6 horas en comparación al valor obtenido en el pulso de 0-1 - horas. (Tabla 5 ).

En el embrión la relación  $C_6/C_1$  disminuye en el pulso de 5-6 horas en - relación al pulso de 0-1 horas en una magnitud similar a la del escute - llum aislado y bajo la misma mecánica : No aumenta la cantidad de  $CO_2$  - que se descarboxila de la  $6-^{14}C$ -glucosa en el pulso de 5-6 horas en rela- ción a la magnitud que se detectó en el pulso de 0-1 horas.(Tabla 6 ). Estos resultados correlacionan fuertemente con el incremento en la acti - vidad de la G6PDH cuantificado in vitro a las 6 horas de imbibición.(Fig. 10 ).

6.3.- DETERMINACION DE LA RELACION  $C_6/C_1$

TEJIDO: EJE EMBRIONARIO TLAXCALA VS 22E .

PULSO (h)	cpm/g ( $\bar{X}$ )	s	$\bar{x}$	C.V.	MARCA	RELACION $C_6/C_1$
0 - 1	37 840	8 061	3 614	21.5	$C_1$	
0 - 1	23 476	1 297	581	5.5	$C_6$	0.62
5 - 6	50 685	13 356	5 989	26.3	$C_1$	
5 - 6	14 312	3 550	1 591	24.8	$C_6$	0.28

Experimento realizado por quintuplicado.

( $\bar{X}$ ) = media

$\bar{x}$  = error estandard.

C.V.= Coeficiente de variación.

s = Desviación estandard.

TABLA 4.-

#### 6.4. DETERMINACION DE LA RELACION $C_6/C_1$

##### TEJIDO: ESCUTELIUM AISLADO TLAXCALA VS 22E.

PULSO (h)	cpm/g ( $\bar{x}$ )	s	$\bar{x}$	C.V.	MARCA	RELACION $C_6/C_1$
0 - 1	5 405	2 291	1 027	42.3	$C_1$	
0 - 1	2 207	735	735	33.3	$C_6$	0.40
5 - 6	6 971	91	40	1.3	$C_1$	
5 - 6	2 388	144	64	6.0	$C_6$	0.34

Experimento realizado por quintuplicado.

$(\bar{x})$  = media

$\bar{x}$  = error estandard

C.V. = Coeficiente de variación.

s = Desviación estandard.

TABLA 5.-

6.5.- DETERMINACION DE LA RELACION  $C_6/C_1$

TEJIDO: EMBRION TLAXCALA VS 22E .

PULSO (h)	cpm/g ( $\bar{X}$ )	s	$\bar{x}$	C.V.	MARCA	RELACION $C_6/C_1$
0 - 1	4 884	1 465	656	29.9	$C_1$	
0 - 1	2 278	285	127	12.5	$C_6$	0.46
5 - 6	5 263	1 922	961	36.5	$C_1$	
5 - 6	2 071	606	271	29.2	$C_6$	0.39

Experimento realizado por quintuplicado.

( $\bar{X}$ ) = media

$\bar{x}$  = error estandard

C.V.=Coeficiente de variación

s =Desviación estandard.

TABLA 6.-

La evaluación del efecto de hormonas y antibióticos sobre el patrón de actividad de la G6FDH, mostró que la Cinetina ejerce una influencia mayor que el ácido giberélico (lo incrementan en un 42 y 22% respectivamente; mientras que los inhibidores de la transcripción: Actinomicina-D y  $\alpha$ -amanitina disminuyen su actividad en un 13 y 100% .

La cicloheximida, suprime este patrón de incremento unicamente a altas dosis ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) (Tabla 7 ) ( Figura 11 ).

TABLA No.7

5.6- EFFECTO DE ACIDO GIBBERELICO, CINETINA Y ACTINOMICINA-D SOBRE LA ACTIVIDAD -  
DE LA G6FDH DURANTE LA GERMINACION EN EMBRIONES AISLADOS DE MAIZ (GERMEN-  
860-1373 POOL DENT.)

TRATAMIENTO	CONCENTRACION ( $\mu\text{g/ml}$ )	ACTIVIDAD ESPECIFICA ( U/ mg proteina )	INCREMENTO ( % )
Embriones secos	--	10.25	--
Control	--	13.50	--
AG <sub>3</sub>	63	16.25	22
Cinetina	40	19.25	42
Actinomicina-D	294	11.25	-13



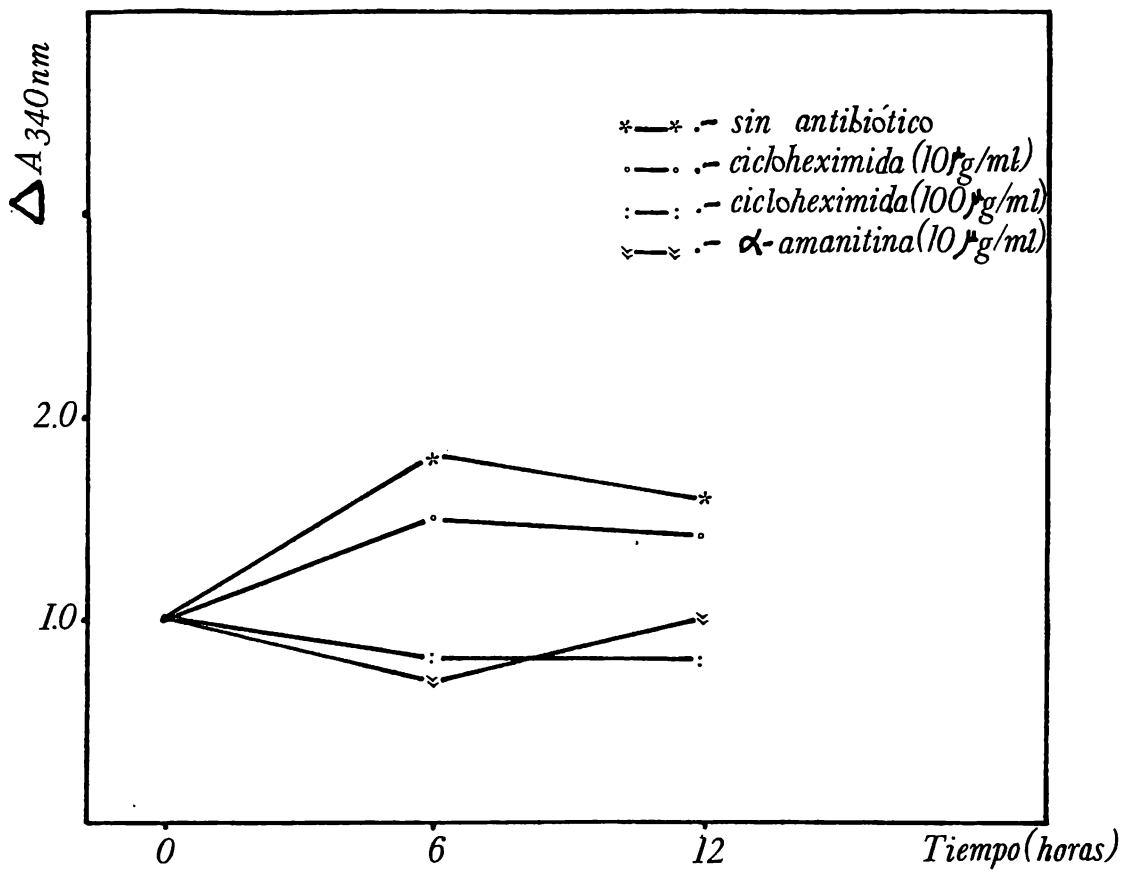


Figura 11.- Efecto de  $\alpha$ -amanitina y Cicloheximida sobre la actividad de la G6PDH, en ejes embrionarios aislados de Tlaxcala VS 22E.

El análisis de distribución de marca radiactiva en carbohidratos solubles en el eje embrionario (Figura 12), muestra una baja incorporación en ribosa cuando se usó 1-<sup>14</sup>C-glucosa como marcador, y una alta incorporación, especialmente en el periodo de 5-6 horas, cuando se usó 6-<sup>14</sup>C-glucosa como marcador, resultando congruentes con el incremento de la actividad de la G6PDH en ese periodo.

En el escutellum, la distribución de marca (Figura 13) muestra un comportamiento similar en cuanto al porcentaje de marca incorporada en la ribosa pero se observa además una tendencia mayor que en el eje embrionario a acumular la marca de los disacáridos (maltosa y sacarosa) y manosa en lugar de mantenerla en la glucosa libre como se observa en eje embrionario.

La distribución de la marca en los azúcares del eje embrionario-unido (Figura 14) muestra una inversión en la incorporación de marca en ribosa, comparativamente a la observada en el eje embrionario aislado, ya que disminuye notablemente la incorporación en el periodo de 5-6 horas cuando se empleó 6-<sup>14</sup>C-glucosa y se mide un ligero incremento, en vez de disminución cuando se usa 1-<sup>14</sup>C-glucosa. El escutellum unido por su parte (figura 15), muestra una alta incorporación relativa de la marca en ribosa tanto en el caso de 6-<sup>14</sup>C-glucosa como 1-<sup>14</sup>C-glucosa, la cual se hace aparentemente a expensas de la glucosa que iba a acumularse como disacárido.

Estos resultados indican:

1.-Que la regulación del metabolismo de carbohidratos y en particular el -

ciclo de las pentosas, opera en forma diferente en el eje embrionario y -  
escutellum.

2.-Que parece existir un transporte de estos metabolitos del escutellum -  
al eje embrionario, el que se muestra por las diferencias en la distribu-  
ción de la marca cuando los tejidos se incuban en forma separada ó uni -  
das. Esto es congruente con una de las funciones fundamentales del escutellum -  
que es de transferir metabolitos propios y del endospermo hacia el eje -  
embrionario.

3.- En el escutellum, las enzimas transaldolasa y transcetolasa parecen -  
tener un papel preponderante en la forma en que se utiliza la glucosa, ya -  
que cuando se analiza este tejido en forma unida, se puede observar una -  
alta incorporación de marca en la ribosa aún cuando se usa  $1-^{14}C$ -glucosa.

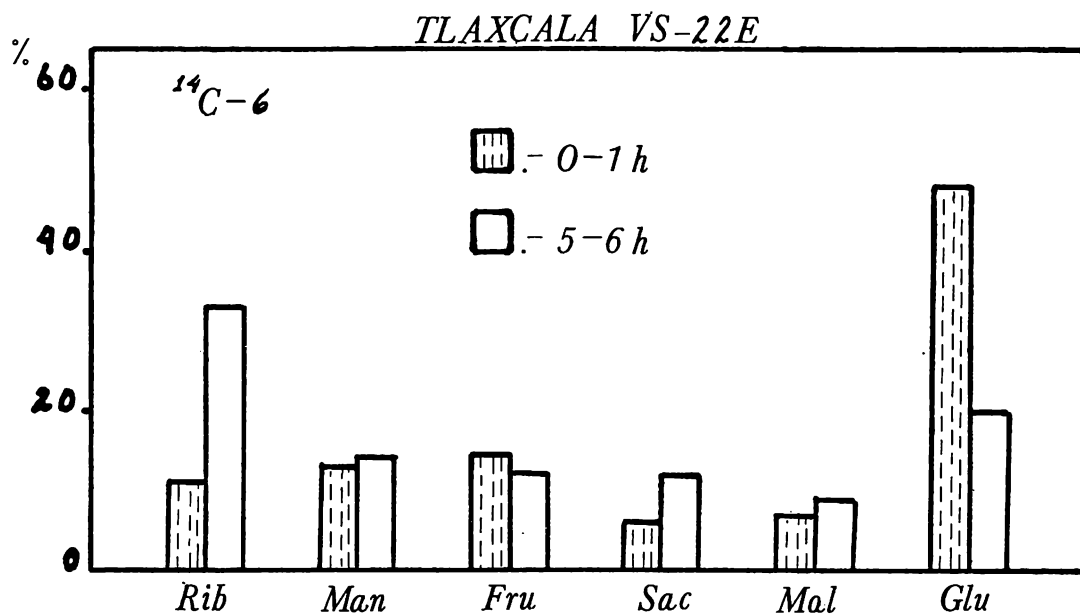
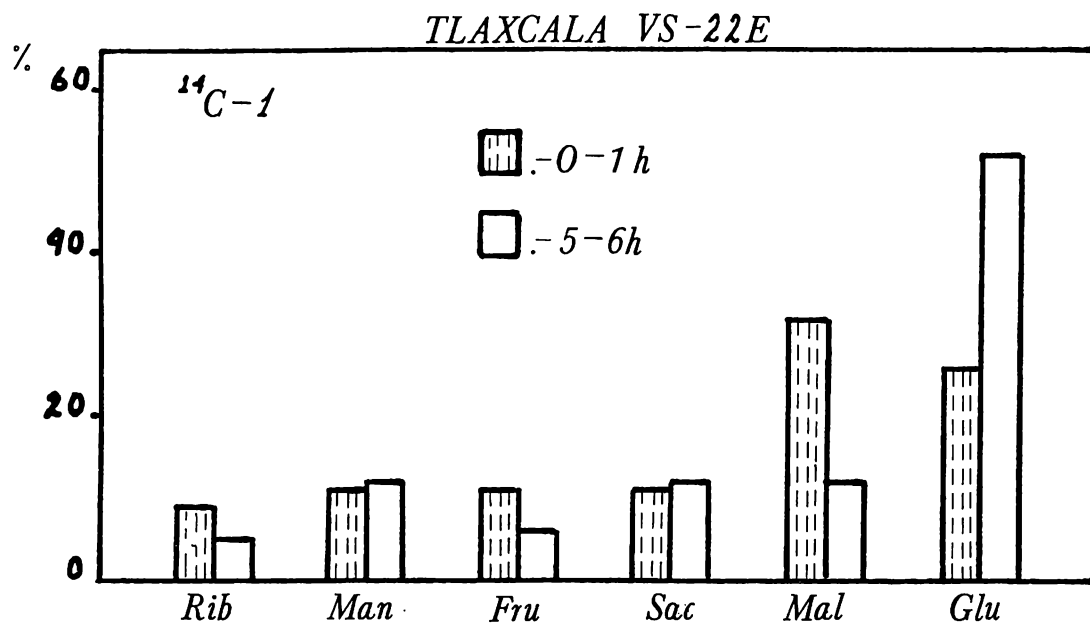


Figura 12.- Distribución de marca radioactiva en carbohidratos solubles de eje embrionario aislado (Tlaxcala VS 22E).

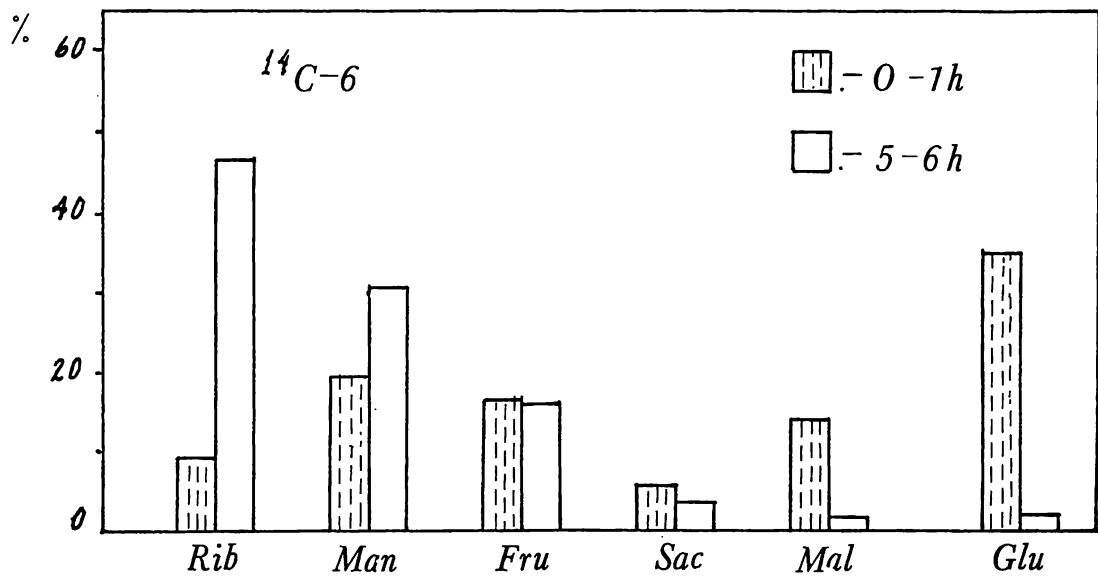
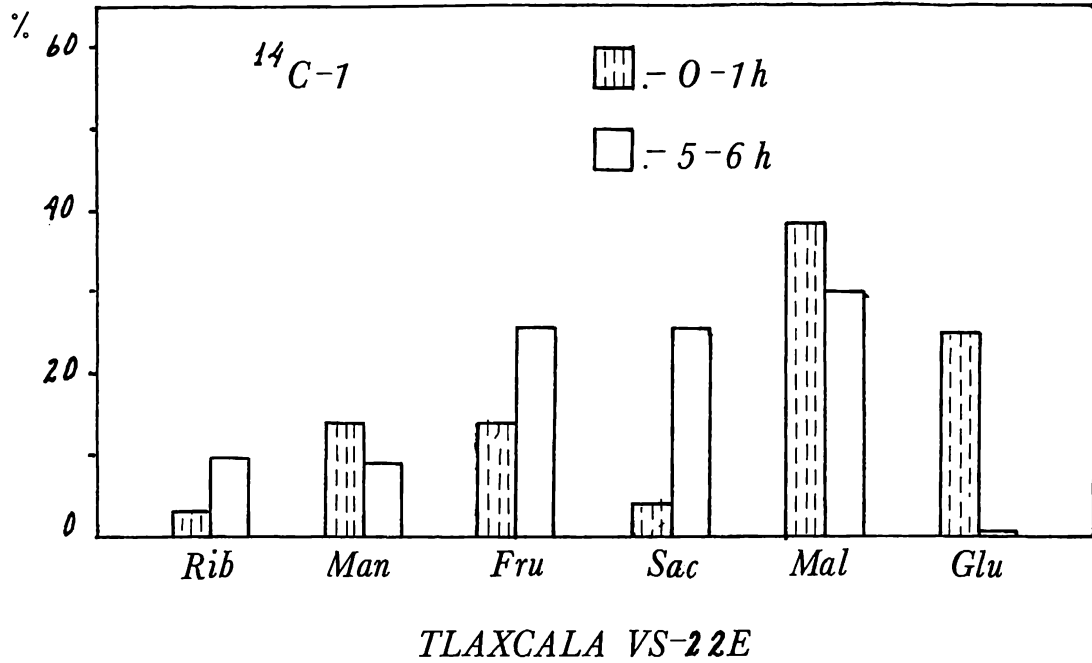


Figura 13.- Distribución de marca radioactiva en carbohidratos solubles de *escutellum* aislado (Tlaxcala VS 22E).

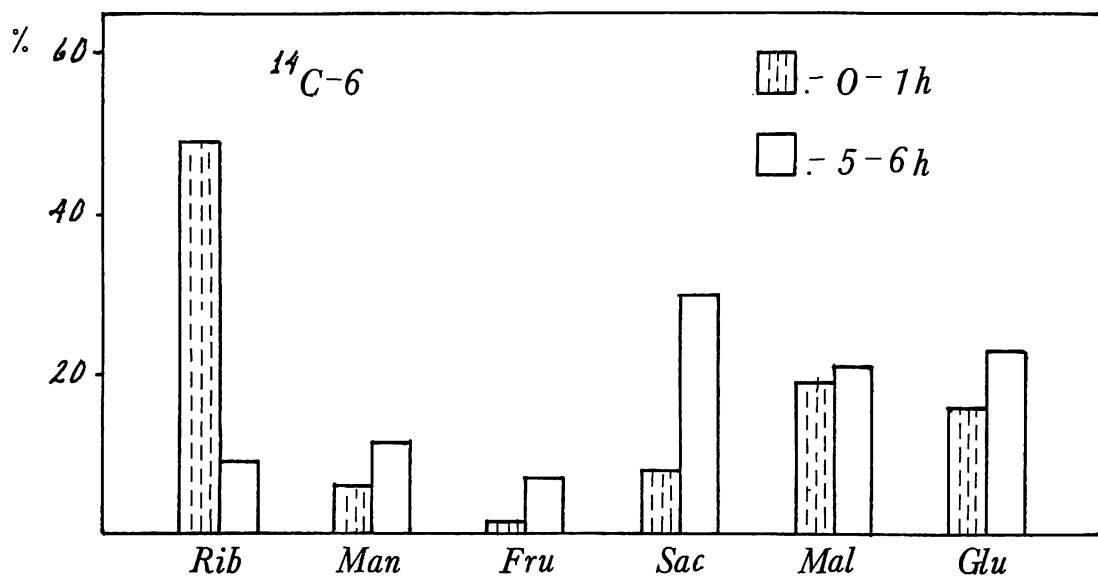
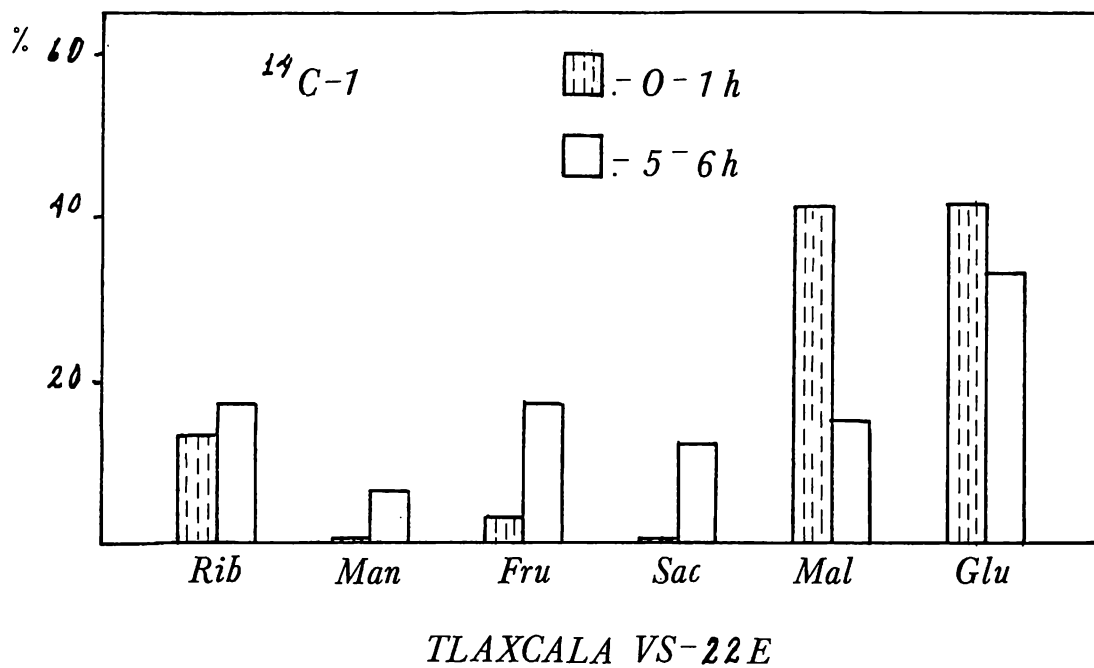


Figura 14.- Distribución de marca radioactiva en carbohidratos solubles de eje embrionario unido (Tlaxcala VS 22E).

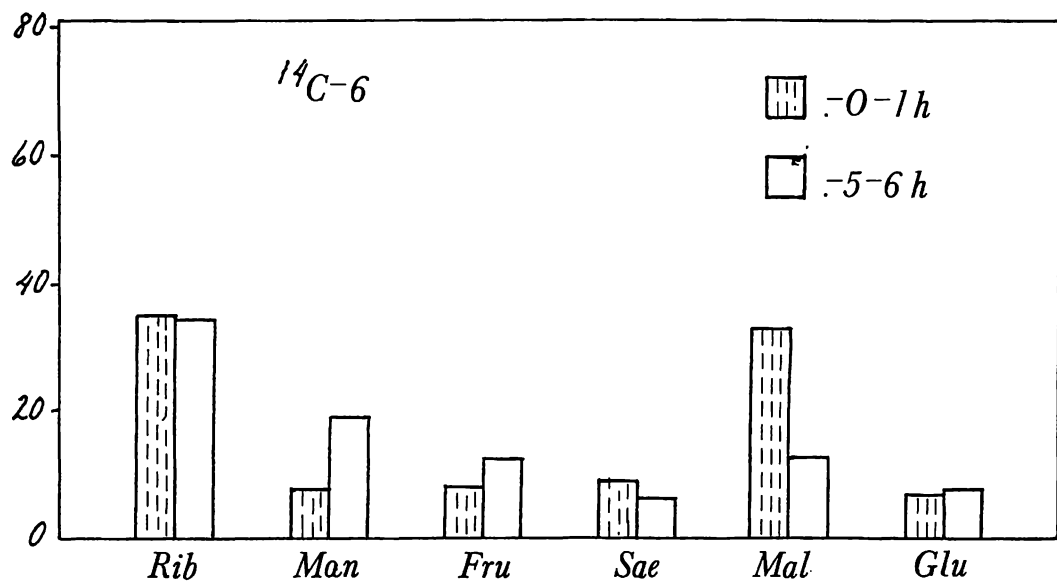
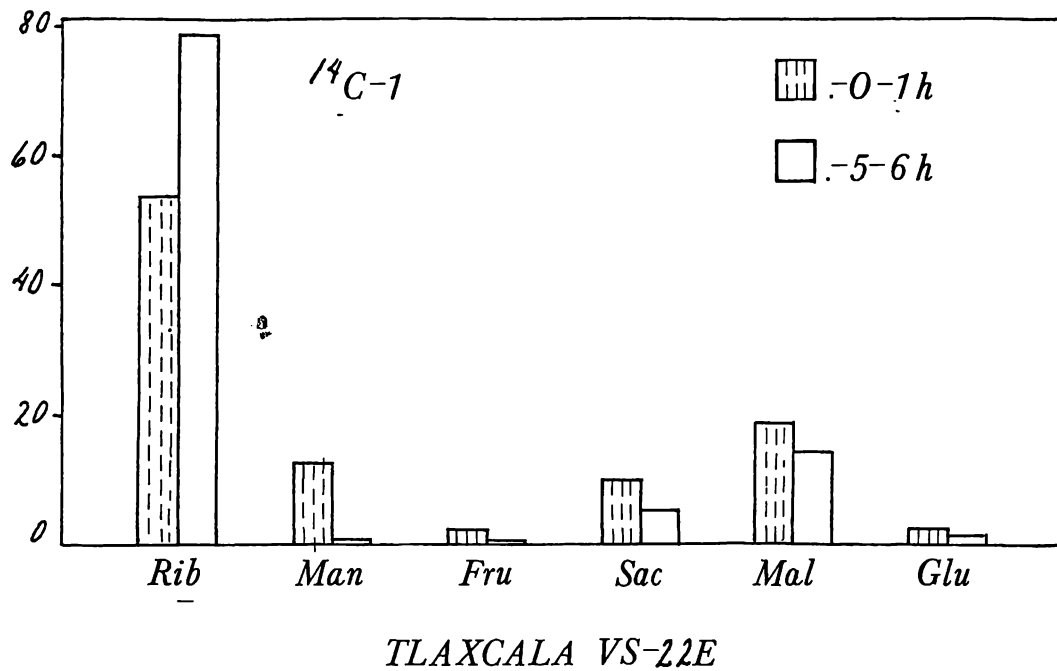


Figura 15.- Distribución de marca radioactiva en carbohidratos solubles de *Escutellum unido* (Tlaxcala VS 22E).

El análisis del comportamiento de la actividad enzimática contra volúmen - de extracto enzimático (disminución de la actividad a volúmenes crecientes - de extracto a concentraciones saturantes de sustratos Figura 16 ) sugirieron la presencia de un posible inhibidor, procediéndose a su búsqueda pudiéndose demostrar que el extracto de eje embrionario seco previa inactivación de la G6FDH endógena por congelación y dializado inhibía aún a la G6FDH de eje embrionario ,escutellum y eritrocito humano. El extracto de escutellum no presentó esta propiedad inhibitoria.

Se hicieron experimentos para caracterizar la naturaleza de este inhibidor - procediéndose a purificarlo previa precipitación con sulfato de amonio mediante filtración en sephadex G-200 (Figura 17 ) y gradiente de centrifugación en sacarosa 5-20% (Figura 18 ), que nos permitió al someter marcadores - protéicos determinar un peso molecular aproximado de 14 000 (Figura 19 ). La desaparición de la capacidad inhibitoria que se observó después de someterlo a hidrólisis con tripsina (previa estandarización de la técnica - (Figuras :20,21 ) se deduce que éste inhibidor es un polipéptido.

La determinación de la capacidad inhibitoria de los extractos crudos dializados de eje embrionario obtenidos durante la germinación, permitieron ubicar la disminución de esta capacidad inhibitoria a medida que la germinación progresa. (Figura 22 ).



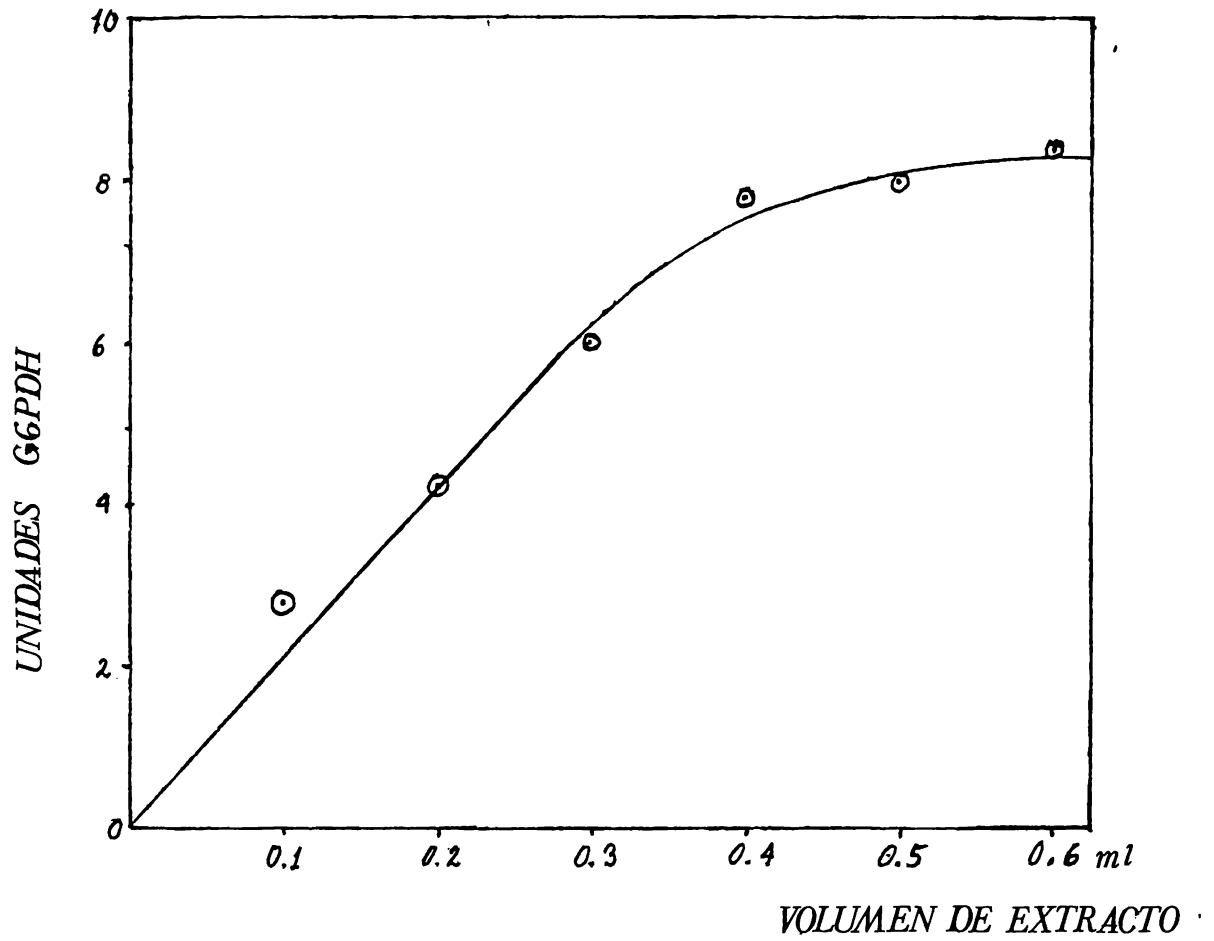


Figura 16.- Actividad de G6PDH contra volumen de extracto de Tlaxcala VS 22E.

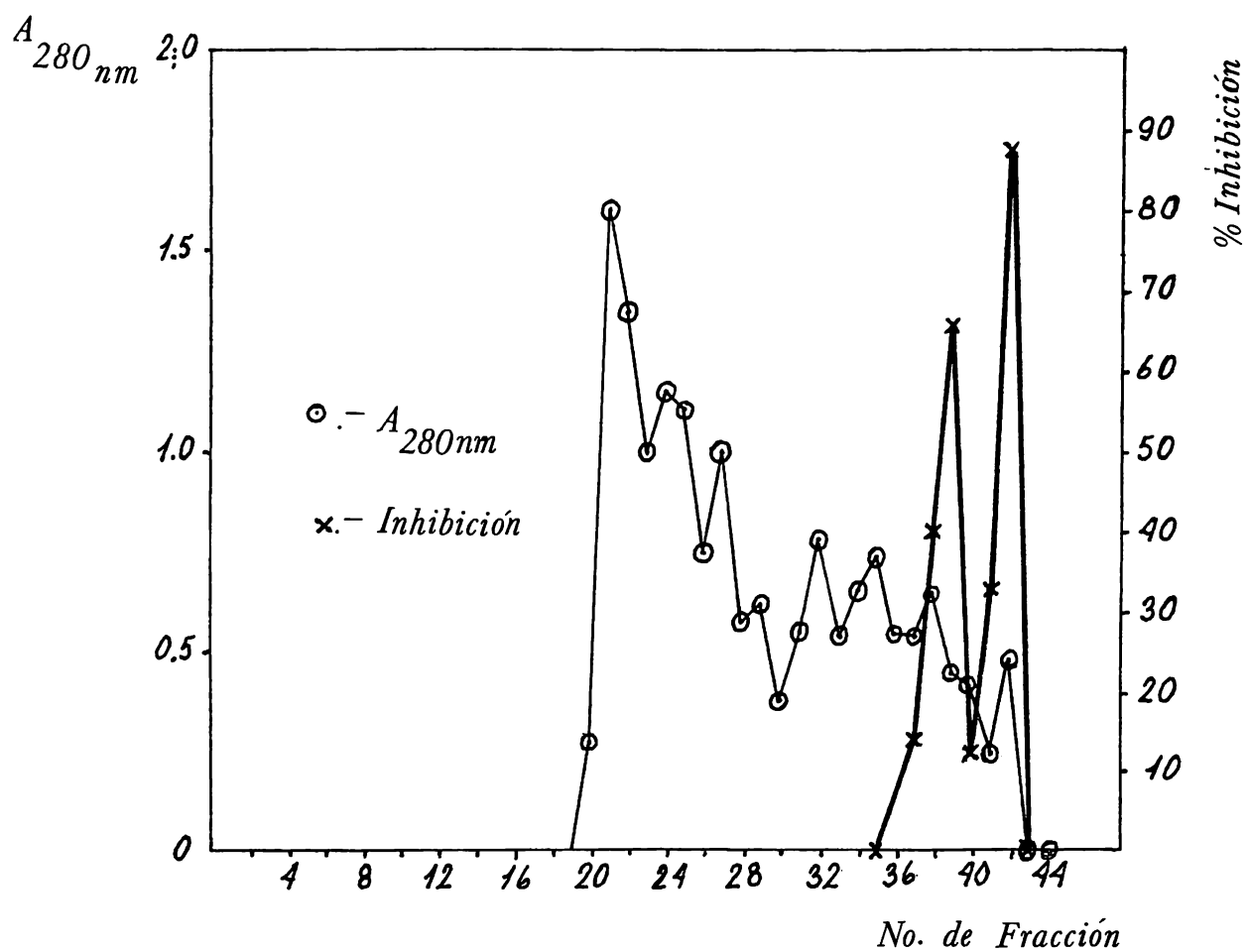


Figura 17.- Cromatografía de filtración en gel de las proteínas precipitadas con sulfato de amonio al 70% y determinación de la actividad inhibitoria contra la G6PDH<sub>3a</sub>.

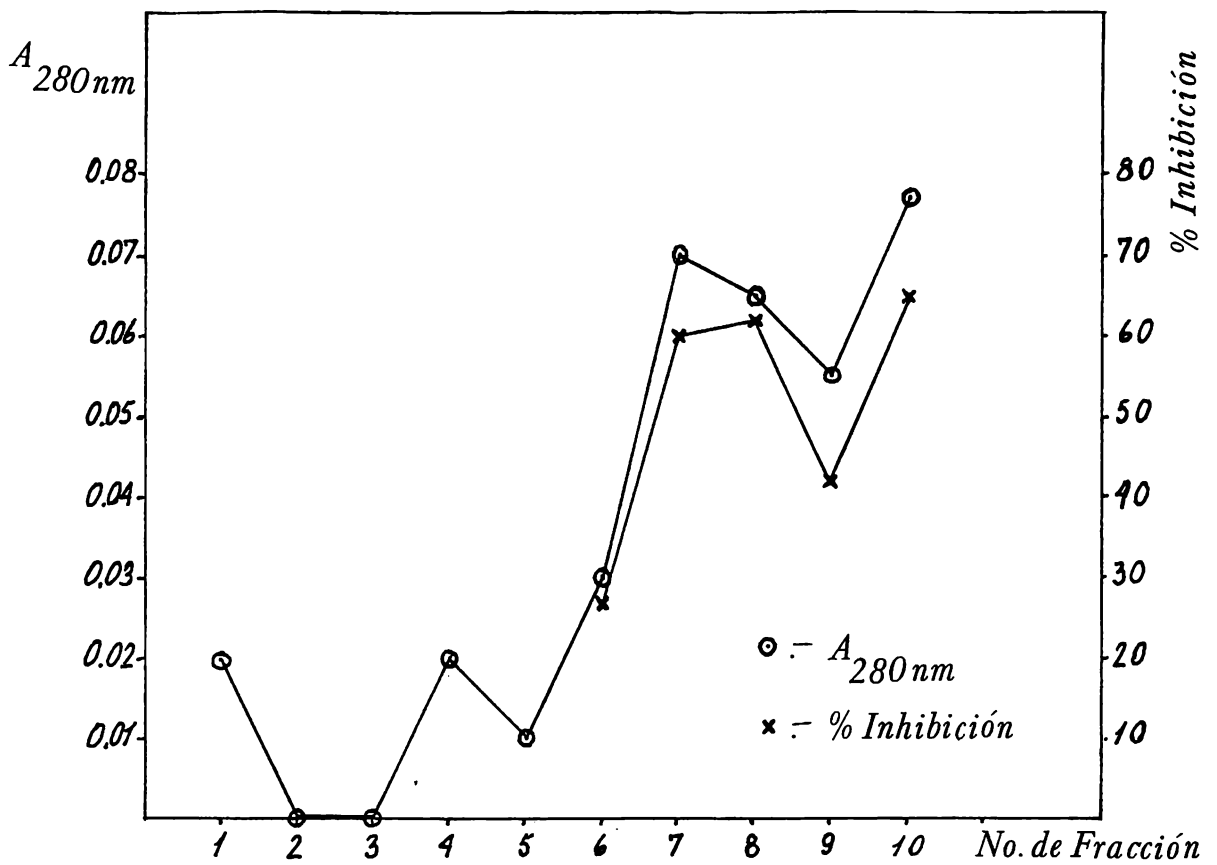


Figura 18.- Centrifugación y gradiente de sacarosa 5-20% de las fracciones 34-44 de la columna de filtración en gel y determinación de la actividad inhibitoria contra la G6PDH.

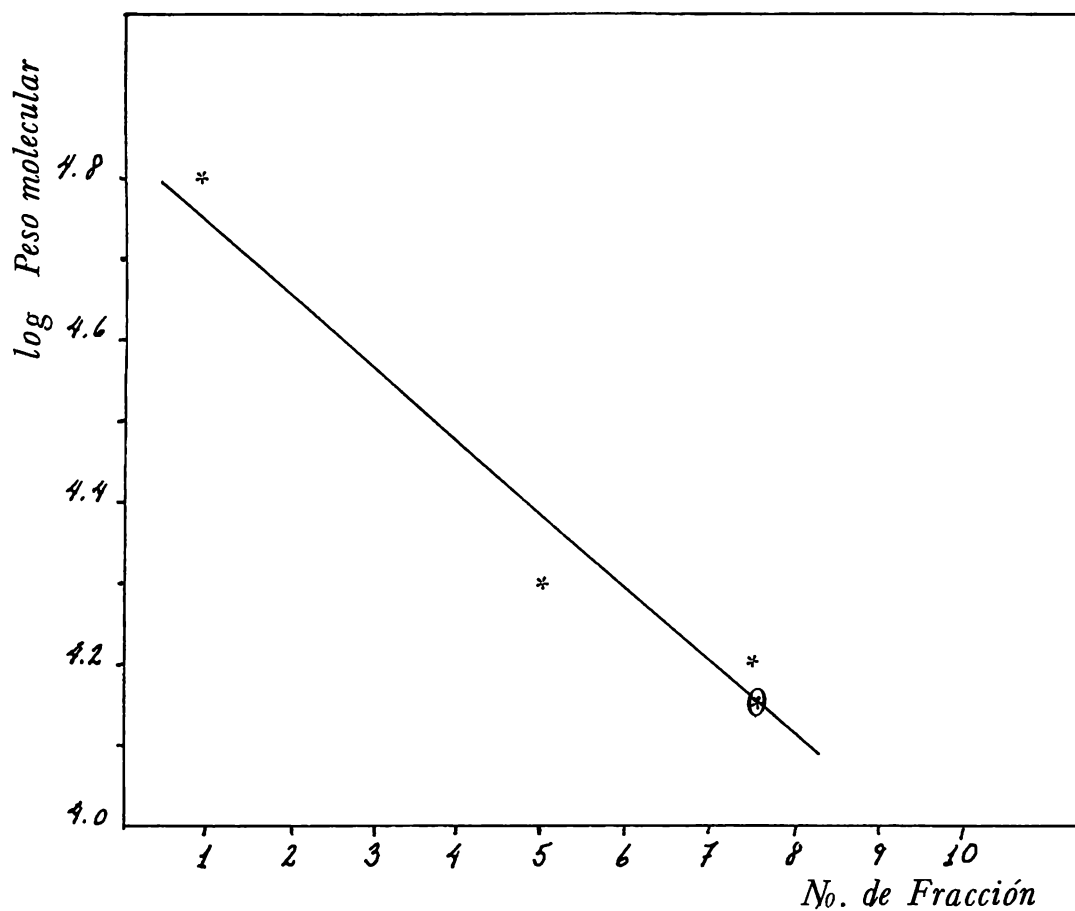


Figura 19.- Determinación del peso molecular aproximado de la fracción pre-téica del gradiente de sacarosa con propiedades inhibitorias.

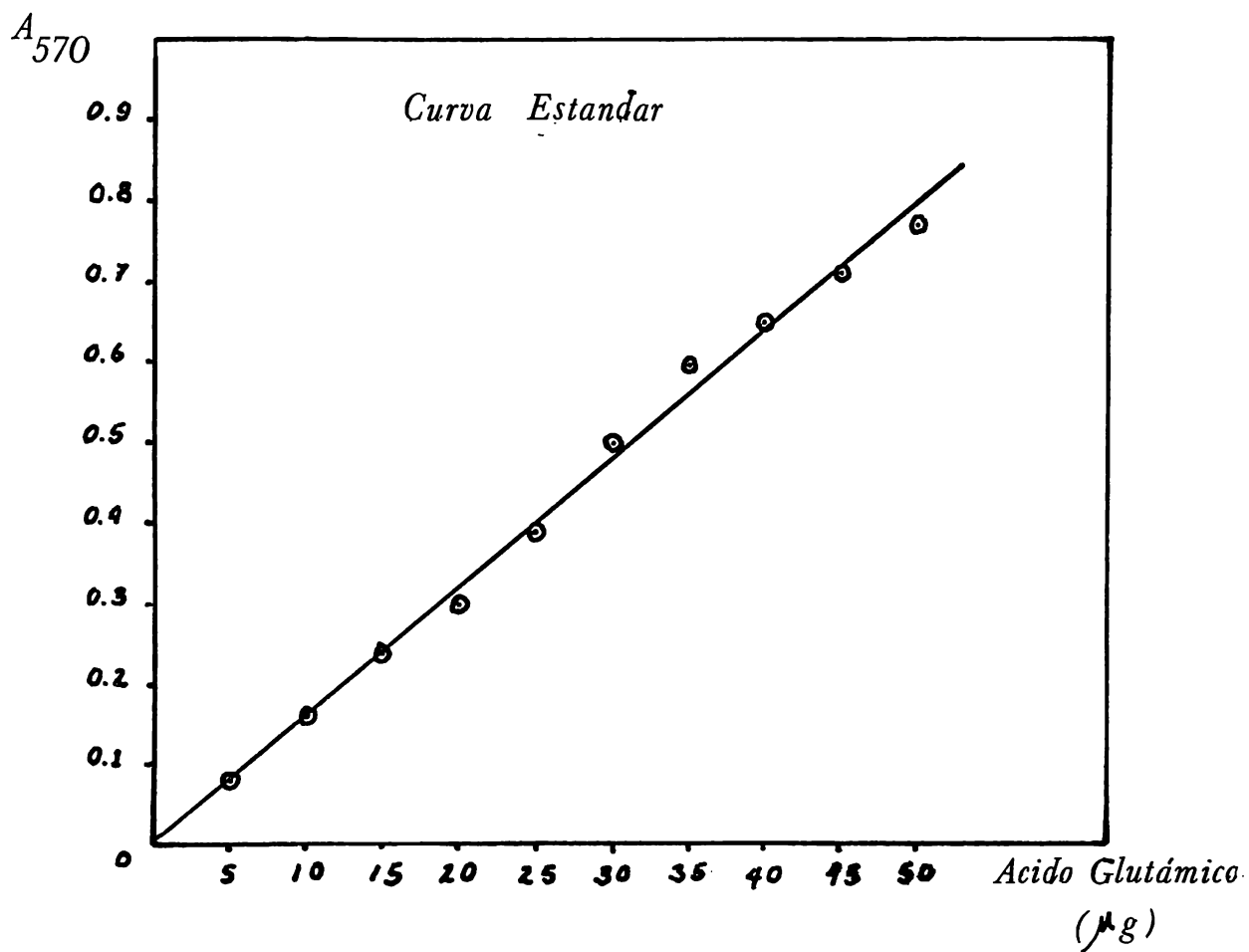


Figura 20.- Curva estandar. Cuantificación de Aminoácidos.

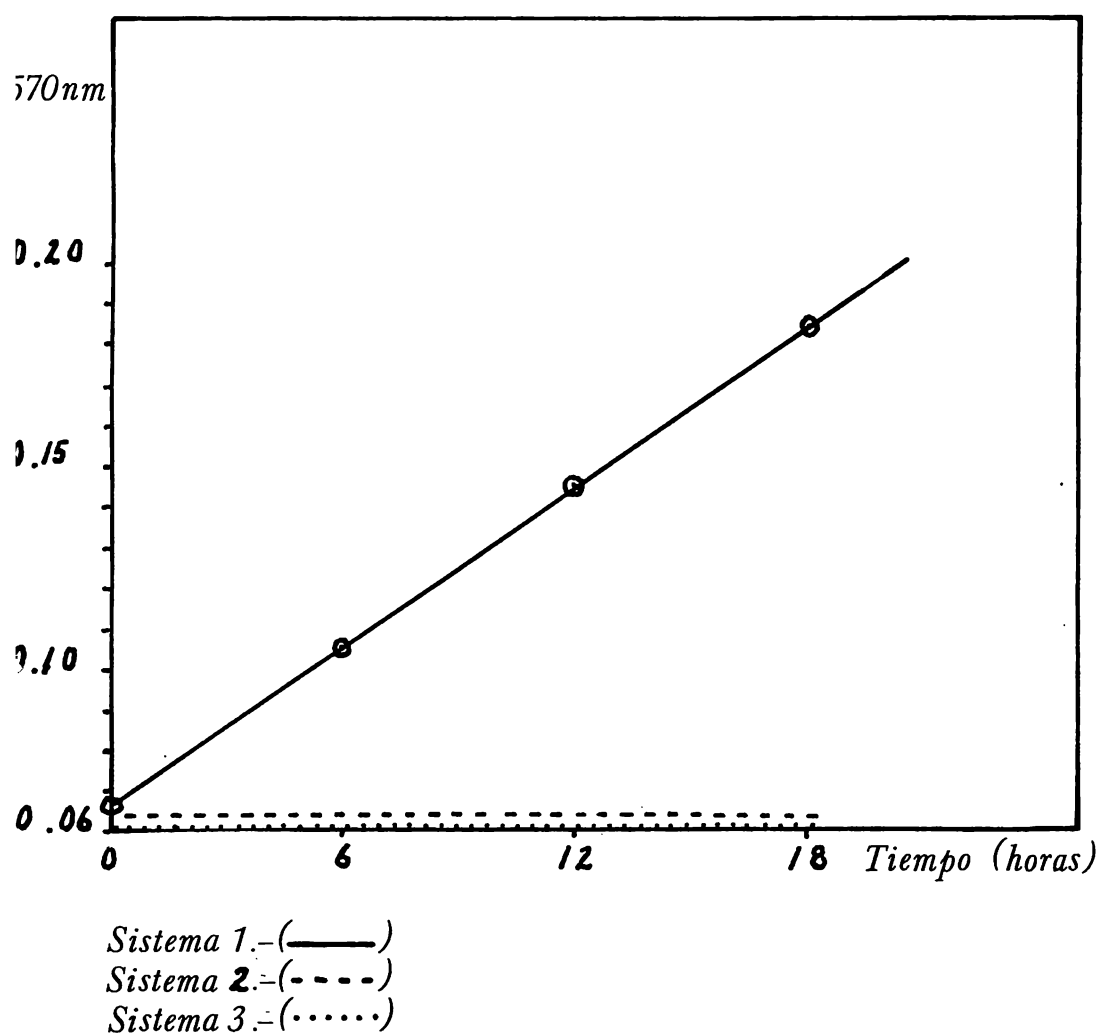


Figura 21.- Gráfica de Referencia para la optimización de la actividad proteolítica.

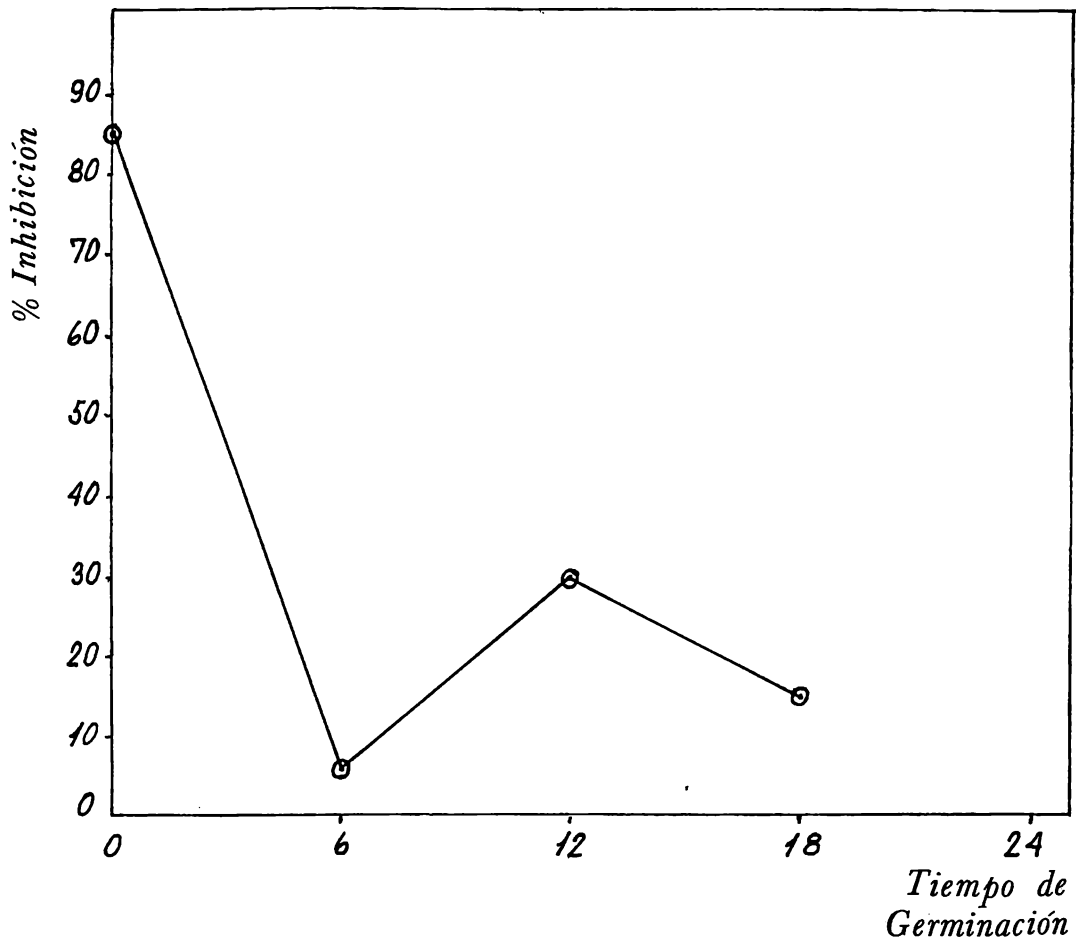


Figura 22.- Comportamiento de los niveles de inhibidor de la G6PDH durante la germinación.

RESULTADOS

B.- GERMINACION PREMATURA



Los datos anteriores permitieron ubicar a la G6FDH como una proteína cuya actividad se incrementa rápidamente durante las primeras horas de imbibición, sujeta a inhibición y a activación hormonal en el evento de germinación.

La manifestación del fenómeno de germinación prematura en maíz en la zona agrícola conocida como "Valles Altos" que comprende parte de los estados de Tlaxcala y Puebla (Faldas del volcán la Malinche), sujeta a estudio para la evaluación de factores varietales, ambientales y de manejo por un grupo de trabajo coordinado por el Dr. Joaquín Ortiz Cereceres investigador del Centro de Genética del Colegio de Postgraduados de Chapingo, Edo de México, nos permitió cuantificar la probable participación de la G6FDH en la expresión de éste fenómeno.

Para este experimento fué seleccionada una área típica de influencia del fenómeno: San Antonio Tlacamilco, Puebla, realizándose en un predio el cual se fraccionó en lotes pequeños para la evaluación de los factores mencionados, sembrándose dos variedades "Resistentes" (no expuestas anteriormente a la región de influencia del fenómeno de germinación prematura): Tlaxcala VS 22E y H-30 y una variedad sensible: (expuesta anteriormente a la zona de influencia del fenómeno) Criollo local el cual, en un caso fué sometido a fertilización con diversas fuentes de nitrógeno, ya que con ante-

rioridad se había observado que la fertilización nitrogenada aumentaba el porcentaje de germinación prematura.

A estas variedades se les determinó:

- 1.- La actividad de la G6FDH durante la formación del grano .(Figs. 23 )
- 2.-La actividad inhibitoria contra la G6FDH .

TOMA DE MUESTRA PARA LA EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE LA G6FDH DURANTE LA -  
MADURACION DEL GRANO.

Para estos estudios se tomaron unicamente los granos localizados en la parte central de la mazorca, descartandose el 33% de ámbos extremos.

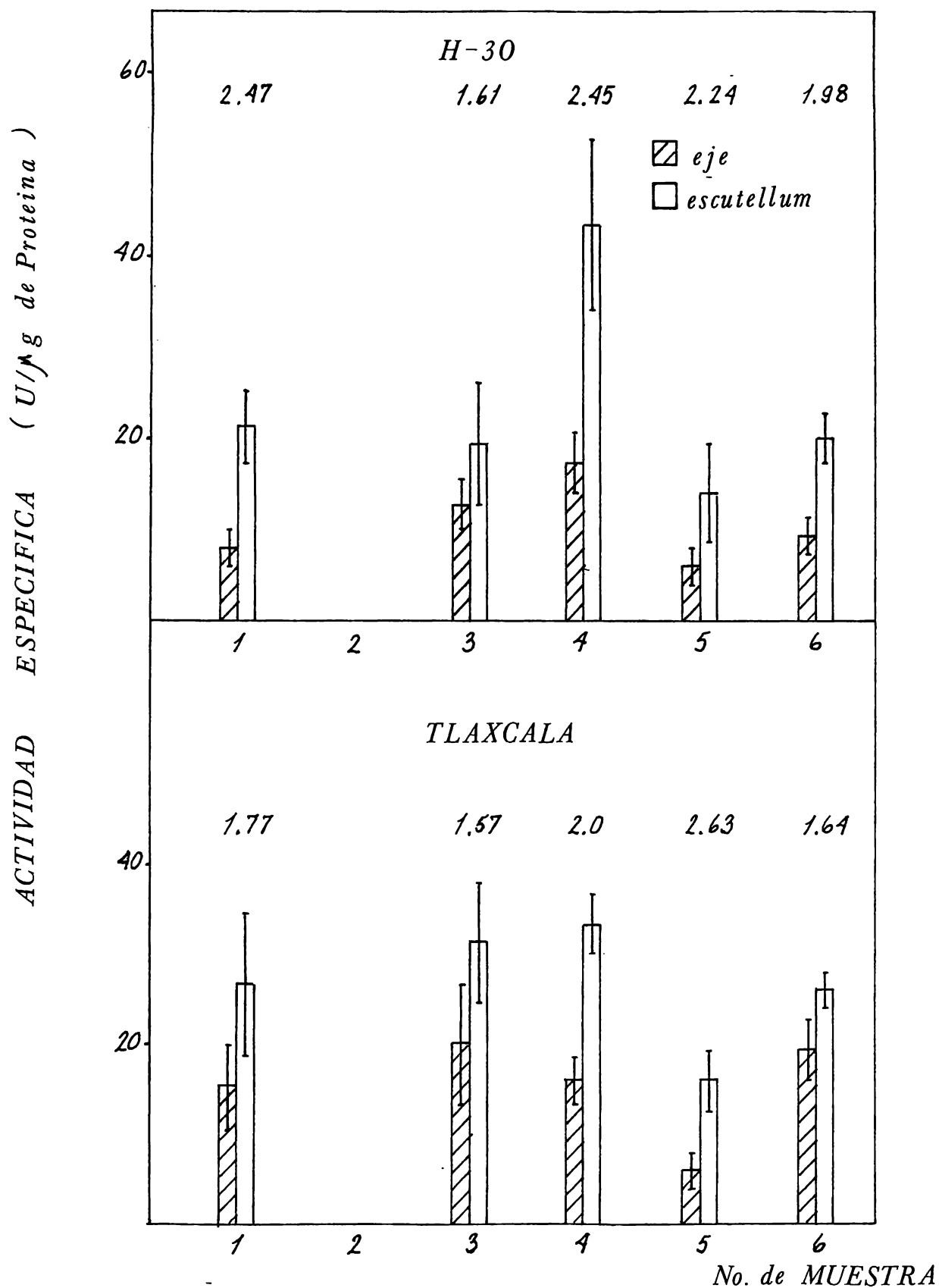


Figura 23.- Actividad de la G6PDH durante la maduración del grano en H-30 Tlaxcala.

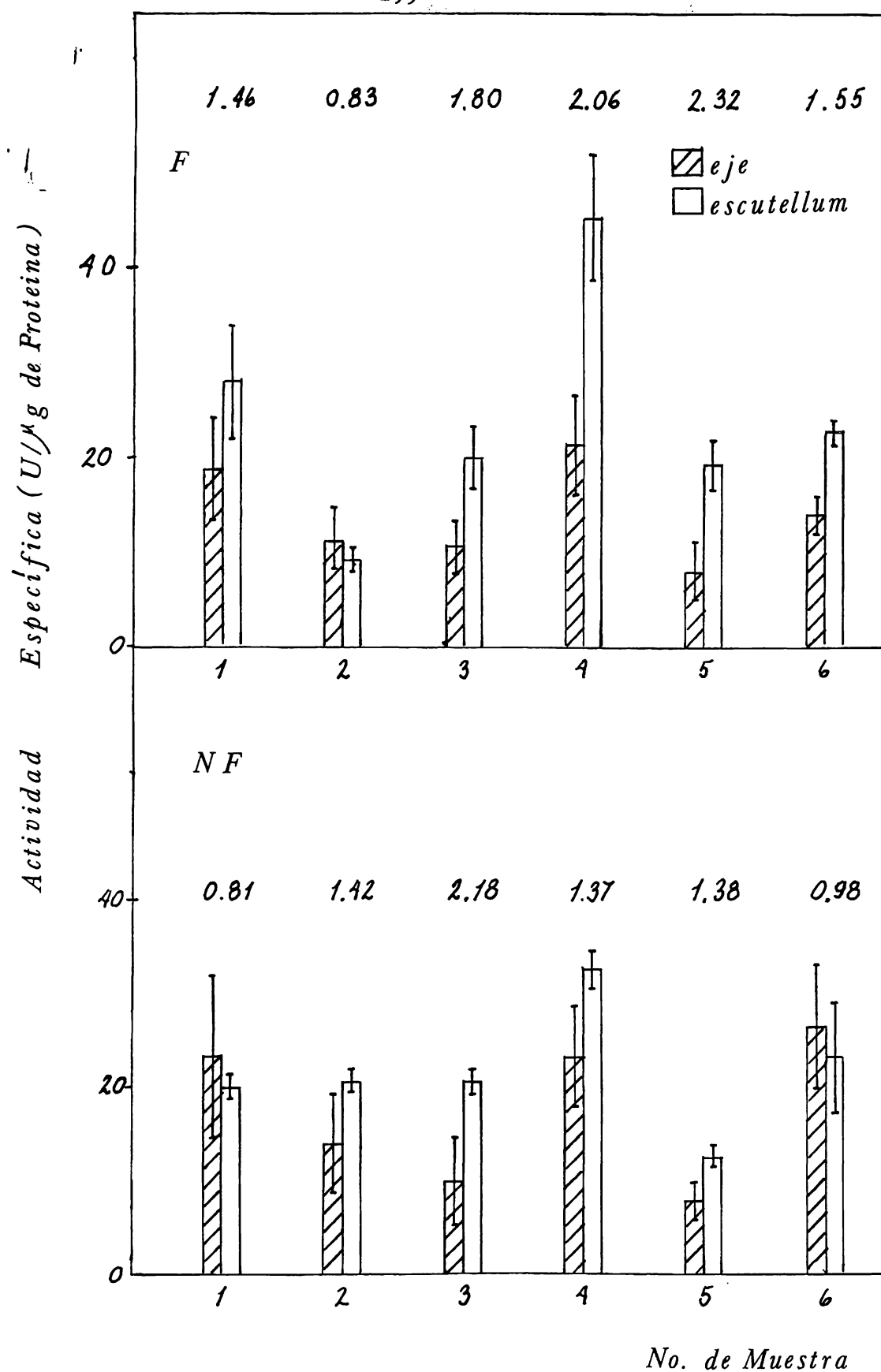


Figura 24.- Actividad de la G6PDH durante la maduración del grano en Criollo local fertilizado (F) y no-fertilizado (NF).

Para tratar de encontrar una posible relación entre la actividad de la - G6PDH de la semilla madura y la sensibilidad a la germinación prematura - se cuantificó esta en diferentes variedades cosechadas en diversas zonas- de cultivo (Figura 25 ).

Se incluyó una variedad criolla : Huamantla cosechado en la zona en que se presentó con mayor severidad la germinación prematura en 1979 (Ignacio Zaragoza, municipio de Huamantla Tlaxcala, puede observarse una baja relación - enzimática escutellum/eje embrionario en las variedades criollas en función- de la alta actividad encontrada en eje embrionario, sugiriendo que la sensibilidad a la germinación prematura puede radicar en el eje embrionario y que en esta pueden estar involucrados eventos metabólicos relacionados con la - vía de las pentosas. (Fig.25 ).

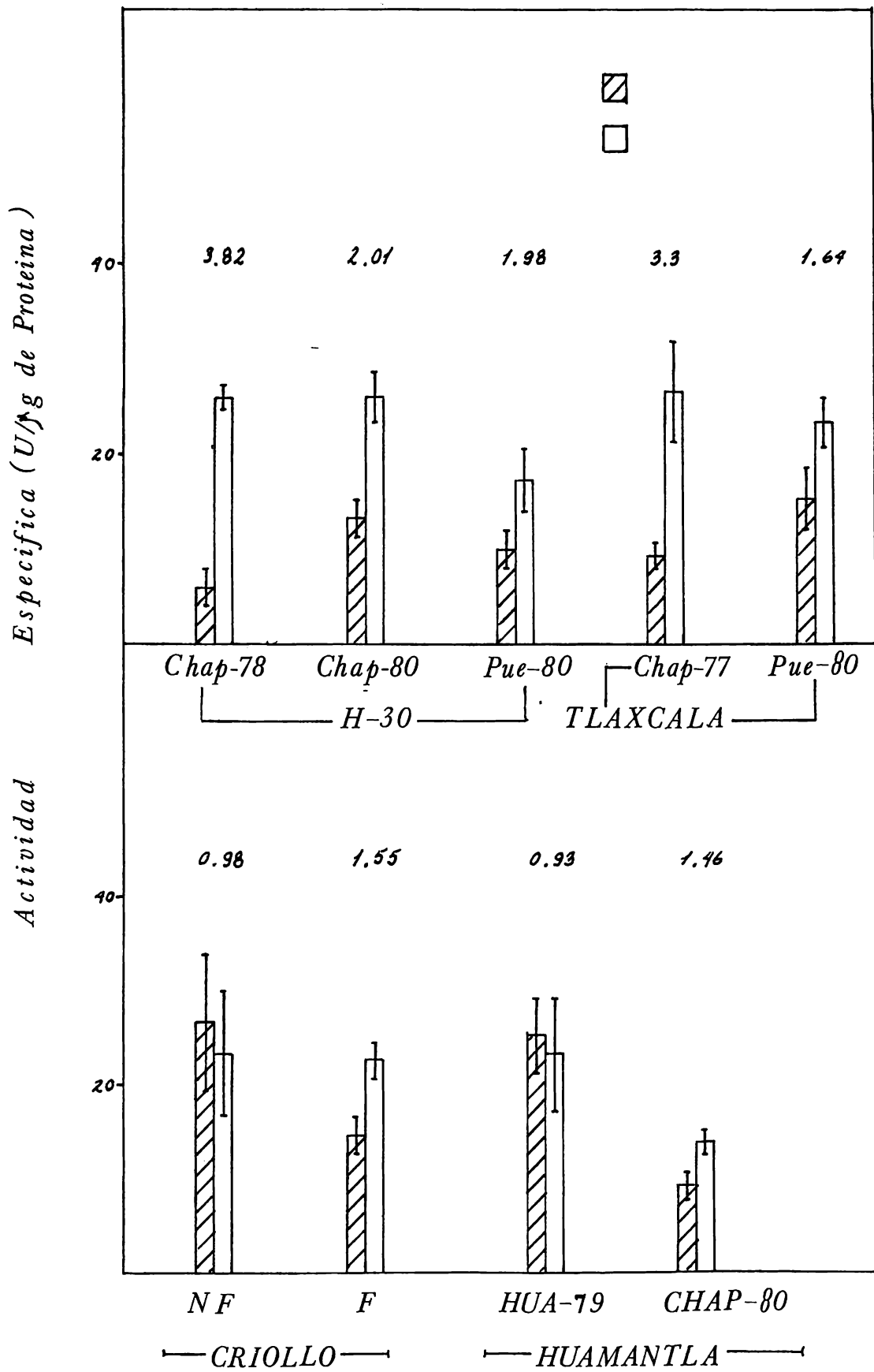


Figura 25.- Cuantificación de la actividad de la G6PDH en semilla madura de diferentes variedades.

En el ciclo agrícola 1981, el grupo responsable de la experimentación en el campo, decidió utilizar como variedades de experimentación a una que se había comportado resistente al brotamiento en el ciclo agrícola anterior: H-139 y a otra sensible : Criollo Local (Tlacamilco), a los cuales se les determinó la actividad de G6PDH durante la formación del grano (Figura 26) - En este experimento en el que se registraron todas las etapas fisiológicas nos permitió establecer la carencia de actividad enzimática en eje embrionario en la muestra de 25 días después de la fecundación, con un incremento progresivo en la misma cuyo máximo se ubicó en la tercera muestra (55 días después de la fecundación ) este incremento coincide con la manifestación de la germinación prematura la cual se inicia a partir de la tercera muestra.

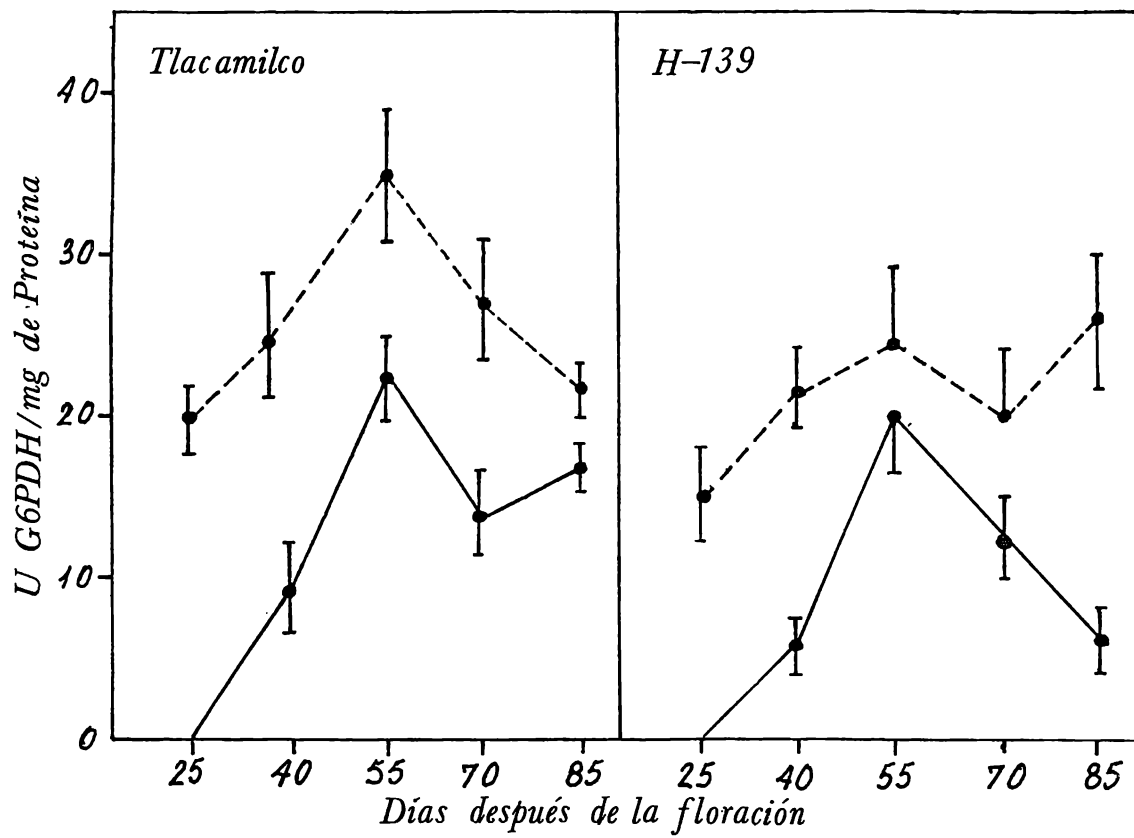


Figura 26.- Actividad de la G6PDH durante la maduración del grano en H-139 y Criollo local (Tlacamilco).

(---) .- Escutellum

(—) .- Eje embrionario



Para conocer el comportamiento de la G6PDH en estas variedades durante la germinación, se determinó su actividad a las 0, 6 y 24 horas de iniciado el proceso (Tabla 8). Comparando los niveles de incremento a las 6 horas de imbibición y determinando al mismo tiempo su capacidad de inhibir a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de eritrocito humano, anexando los datos agronómicos de germinación prematura (sensibilidad) para el área de cultivo y ciclo agrícola (Tabla 9).

De los anteriores resultados destacan: la disminución de la actividad enzimática en el eje embrionario de las variedades criollas a las 6 horas de germinación (Criollo de Tlacamilco, Criollo de Huamantla) y el mantenimiento de los niveles de actividad en el H-139, así mismo es notoria la carencia de capacidad inhibitoria en las variedades cultivadas en el área de influencia del fenómeno de germinación prematura (Tabla 9).

El escutellum mantuvo el nivel de actividad durante la germinación en las variedades criollas cultivadas en el área de influencia con excepción del H-139.

T A B L A No 8

ACTIVIDAD DE G6FDH DURANTE LA GERMINACIONTEJIDO : EJE EMBRIONARIO.

<u>V A R I E D A D</u>	<u>T I E M P O D E G E R M I N A C I O N (h)</u>		
	0	6	24
TLAXCALA VS 22E	8.5	19.5	12.0
CRIOLLO (TLAC)	27.6	18.3	30.8
H-139 (TLAC)	19.3	23.6	25.0
HUAMANTLA (TLAX)	22.2	10.0	_____

TEJIDO: ESCUTELIUM.

TLAXCALA VS 22E	28.6	40.5	8.0
CRIOLLO (TLAC)	36.1	61.2	48.3
H-139 (TLAC)	44.6	49.0	68.1
HUAMANTLA (TLAX)	20.5	16.0	_____

TLAC=San Antonio Tlacamilco,Puebla.

TLAX=Ignacio Zaragoza,Huamantla,Tlaxcala.

T A B L A No. 9INCREMENTO EN LA ACTIVIDAD DE LA G6FDH A LAS 6 HORAS DE IMBIBICION.

<u>VARIEDAD</u>	<u>% DE INCREMENTO:</u>			<u>GERMINACION -</u>
	<u>EJE EMBRIONARIO</u> (U/ mg)	<u>ESCUTELLUM</u>	<u>INHIBIDOR</u>	<u>PREMATURA</u>
TLAXCALA VS 22E(1979)	234	136	+	-
H-30 (1979)	250	163	+	-
H-139(TIAC.1980)	120	91	-	+
CRIOLLO (TIAC.1980)	67	167	-	+
HUAMANTLA (TLAX.1979)	47	60	-	+

100%=Actividad cuantificada en el tejido seco.

TIAC.=San Antonio Tlacamilco,Puebla.

TLAX.=Ignacio Zaragoza,Huamantla,Tlaxcala.

TLAXCALA VS 22E=Cosechado en Chapingo,Edo. de México.

H-30=Cosechado en Chapingo,Edo. de México.

Al criollo de Huamantla, se le determinó la relación  $C_6/C_1$  (tabla 10) y la distribución de marca radiactiva en carbohidratos solubles (Figura 27). Estos resultados permitieron puntualizar un incremento en la actividad de la vía de las pentosas medido in vivo (no detectado en la medición enzimática) durante el pulso de 5-6 horas (la relación  $C_6/C_1$  cambia de 1.81 en el pulso de 0-1 horas a 0.78 en el pulso de 5-6 horas) (tabla 10). Este incremento en la vía metabólica se originó por una dinámica diferente al detectado en la variedad tlaxcala VS 22E (Tabla No 4) en esta variedad el incremento en la vía de las pentosas se efectuó mediante la conjugación de dos efectos: Aumento en la captación de  $CO_2$  que se respira al suministrar  $1-^{14}C$ -glucosa (pulso de 5-6 horas) y una disminución en la captación de  $CO_2$  respirado al incubar el tejido con  $6-^{14}C$ -glucosa (pulso de 5-6 horas) (tabla 4).

En el criollo de Huamantla no se presenta un aumento en la cantidad de  $CO_2$  que se respira al suministrar  $1-^{14}C$ -glucosa (pulso de 5-6 horas), la relación cambia debido a una disminución en la captación de  $CO_2$  cuando se incubaba con  $6-^{14}C$ -glucosa (pulso de 5-6 horas) (Tabla 10).

La distribución de marca radiactiva en carbohidratos solubles (Figura 27) mostró una acumulación de marca en Ribosa, Fructosa, Manosa y disacáridos principalmente en el pulso de 0-1 horas con marca proveniente de  $6-^{14}C$ -glucosa.

DETERMINACION DE LA RELACION  $C_6/C_1$

---

TEJIDO: EJE EMBRIONARIO HUAMANTLA 1979.

PULSO (h)	cpm/g ( $\bar{X}$ )	s	$\bar{x}$	C.V.	MARCA	RELACION $C_6/C_1$
0 - 1	15 430	1 016	720	6.5	$C_6$	
0 - 1	28 048	11 006	7 805	39.2	$C_1$	1.81
5 - 6	14 510	1 257	891	8.6	$C_6$	
5 - 6	11 358	1 187	841	10.4	$C_1$	0.78

Experimento realizado por duplicado.

$(\bar{X})$  = media

$\bar{x}$  = error estandar

C.V.=coeficiente de variación.

s =desviación estandar.

TABLA No. 10

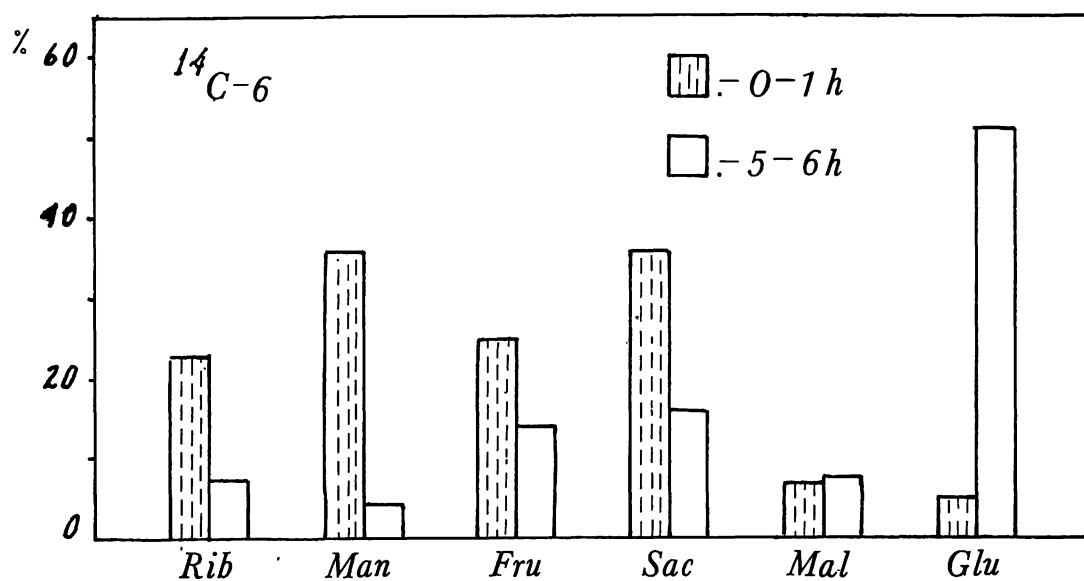
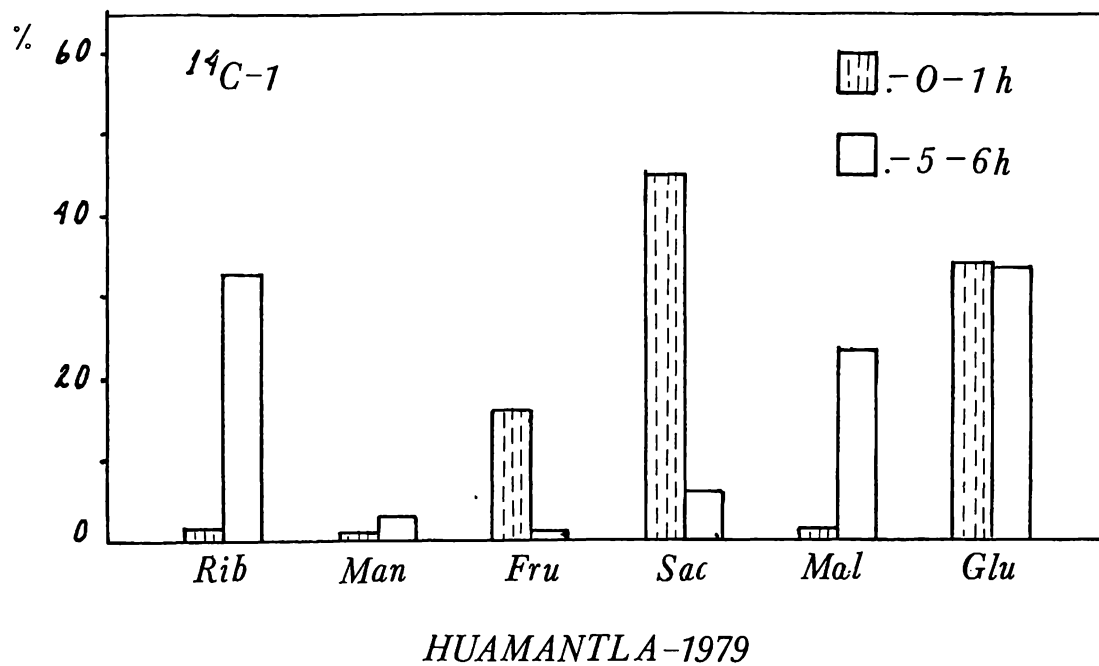


Figura 27.- Distribución de marca radioactiva en carbohidratos solubles de eje embrionario aislado (Criollo de Huamantla).

Los resultados de actividad enzimática obtenidos en todas las variedades - zonas de cultivo y ciclos agrícolas analizados, se agruparon en función - de la actividad de G6PDH y la observación agronómica de sensibilidad a la germinación prematura evaluada por el grupo de trabajo que realizó el experimento de campo (Tabla 11).

T A B L A N°11ACTIVIDAD DE LA G6FDH EN TEJIDOS DE MAIZ SECO.

<u>VARIEDAD</u>	<u>COSECHA</u>	<u>ACTIVIDAD ESPECIFICA</u>		<u>RELACION</u>	<u>GERMINACION --</u>
	<u>AÑO</u>	<u>EJE</u>	<u>ESCUTELLUM</u>	<u>ESC/EJE EMB.</u>	<u>PREMATURA</u>
TLAXCALA (CHAP)	1977	8.0	30.0	3.3	---
TLAXCALA VS 22E	1977	9.8	28.0	3.3	---
H-30 (CHAP)	1978	9.0	27.5	3.3	---
H-30 (CHAP)	1980	14.0	44.0	3.0	---
H-30 (TLAC)	1980	17.5	37.0	2.1	+
CRIOLLO (TLAC)	1980	28.0	35.0	1.2	++
CRIOLLO (TLAC)	1981	27.6	36.1	1.3	++
H-139 (TLAC)	1981	19.3	44.6	2.3	+++
HUAMANTLA (TLAX)	1979	26.0	25.0	0.9	++++



DISCUSSION

PARTE "A" .- GERMINACION NORMAL.

El inicio de la germinación muestra un aumento significativo en la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en escutelo, particularmente en eje embrionario. La actividad determinada in vitro en Tlaxcala VS 22 E -- 1979 (Fig. 10) y en Germen 860-1373 pool dentados (Fig. No. 9 ) como in vivo en Tlaxcala VS 22 E (Tablas :4,5,6. ) confirma que esta enzima está ligada al inicio de la germinación en maíz de igual manera que en Avena fatua (Kovacs, M. .; G.M. Simpson, 1976) y en Corylus avellana (Gosling, P.G.; J.D. Ross, 1980) (Figs. 4 ). Asimismo, la distribución de marca radiactiva en los azúcares del eje embrionario (Fig. No. 12) manifiesta un incremento en el porciento de marca incorporada a ribosa durante el período de 5-6 horas cuando se suministra glucosa( $^{14}\text{C}$ -6), lo cual es consistente con los resultados antes mencionados.

La detección de un inhibidor en el eje embrionario de naturaleza protéica contra G6PDH (PM aproximado 14 000, Fig. No. 19 ), su disminución durante el proceso de germinación (Fig. No. 22 ) y su ausencia en escutelo, así -- como la diferencia en el perfil e incremento de la actividad de G6PDH encontrada durante la germinación en escutelo y eje embrionario, sugieren -- que la vía de las pentosas puede estar desempeñando funciones diferentes en estos dos tejidos y que probablemente se regula también por mecanismos diferentes en cada uno de ellos. Esto es así mismo apoyado por los resultados de la distribución de la marca radioactiva incorporada a carbohidratos solubles, en los extractos de los tejidos de los experimentos en que

se determinó la G6PDH in vivo (Figs. 12-15, ). Esta diferencia en la capacidad de metabolizar glucosa entre eje y escutelo la presentan otros tejidos como trigo y cebada (Anderson et al 1971).

El desarrollo ontológico de estos tejidos y su función durante la germinación sugieren esta posibilidad, el escutelo (primera hoja del tallo central del eje embrionario que comprende de 5 a 6 internodos soportando cada nudo una hoja), como todos los tejidos embrionarios se define morfológicamente a los 10 días después de la polinización, en esta etapa el escutelo es el que presenta el mayor desarrollo de todos los tejidos embrionarios (Sass, J.E. 1955), unido al eje embrionario mediante el nudo escutelar no desarrolla propiamente funciones de follaje sino las de un órgano de reserva que digiere y absorbe los constituyentes del endospermo, regulando su movilización al eje embrionario durante la germinación (Kiesselbach, T.A. 1980). El tejido que lo delimita del endospermo está compuesto por células con actividad secretoria, en maíz y arroz estas células epiteliales son el sitio de síntesis de proteasas y de alfa amilasa (Okamoto, K.; T. Akazawa, 1979). Dentro de este esquema de movilización de material de reserva que presenta el escutelum se encuentra un sistema de transporte de maltosa y sacarosa dependiente de energía (Humphreys, T. 1981).

En el eje embrionario, por el contrario, se desarrollan los eventos metabólicos que involucran en todas sus facetas a la vía de las pentosas, durante la germinación la mitosis se inicia en la región del eje embrio--

nario con la siguiente secuencia: parte media entre la punta de la raíz y la lámina escutelar, corteza, base del primer internudo (mesocotilo), base del coleoptilo y la hoja marginal; procesos todos ellos que requieren tanto de las pentosas para la síntesis de ácidos nucleicos, como de NADPH para la elongación de la pared celular. Antes de la germinación, las células escutelares son uninucleadas, a diferencia de las células del endospermo que son trinucleadas. Durante la germinación, la cromatina de las células del epitelio escutelar se tiñe más profundamente que las de las células internas, los núcleos de este tejido se vuelven profundamente lobulados, estos lóbulos pueden seccionarse formando células multinucleadas que no se dividen (Sass, J.E. 1955). Todas estas funciones requieren también la función del ciclo, aunque la relación de los metabolitos requeridos puede ser diferente.

Esto sería congruente con las diferencias en los incrementos de la actividad enzimática encontrada en los 2 tejidos. El escutelum presenta una actividad de G6PDH medida tanto in vitro (Fig. No.10) como in vivo (Tablas 4 - 6) mayor que la del eje embrionario pero con un incremento relativo menor a las 6 horas de germinación (Fig. No.10).

La pequeña disminución de la actividad enzimática en el embrión en presencia de cicloheximida y Actinomicina-D y su disminución con  $\alpha$ -amanitina y altos niveles de cicloheximida (Tabla 7 y Fig. No.11), sugieren que en la expresión de esta actividad puede estar involucrada la síntesis de no-

vo de ARN mensajero específicos para la enzima.

Se ha sugerido que durante la formación de la semilla se desarrollan mecanismos dirigidos, en términos generales, a la represión de los genes que codifican para las enzimas que degradan las sustancias de reserva (Payne, P.I. 1976). Por otro lado, durante la germinación, la expresión genética a través de la síntesis de proteínas es un prerequisite indispensable para el subsecuente crecimiento celular (Payne, P.I. 1977), se considera, así mismo, que en este proceso se encuentran involucrados los ARN mensajeros almacenados (Jendrisack, J. 1980). De tal manera que la separación entre la transcripción (ARN sintetizado de novo) y la traducción (ARN almacenado) demostrada en enzimas como la Carboxipeptidasa A (Ihle, J.N. et al 1972), la alfa amilasa (Ho, T.H.D. et al 1974), la ADN polimerasa dependiente de ADN (Mory, Y.Y. et al 1975), alcohol deshidrogenasa (Ho, T.H.D. et al, 1975), y 3'nucleotidasa (Zhu, Z.P. et al 1983), significan un tipo de mecanismo de regulación que dota al embrión de control sobre la embriogénesis y el proceso de la germinación. La G6PDH parecería ser una enzima regulada por este sistema, dadas las características arriba señaladas. Más aún, en embrión de trigo se ha encontrado que la G6PDH que se expresa al inicio de la germinación es una actividad que proviene de síntesis de novo de proteínas aparentemente basada en la presencia de un ARN mensajero almacenado (Hernández, T. 1979).

Estos resultados no descartan otros tipos de regulación de la enzima. Así, es notable el incremento observado (42%) en los ejes embrionarios de maíz de la actividad de la G6PDH en presencia de cinetina (40  $\mu\text{g/ml}$ ). La participación de cinetina en la regulación de actividades enzimáticas durante la germinación (proteasas) ha sido demostrada en Phaseolus vulgaris, pero su mecanismo no se ha establecido (Gepstein, S. et al 1980). Asimismo, el incremento de esta enzima por la presencia de  $\text{AG}_3$  es también muy significativa (Tabla 7 ).

Es interesante resaltar las diferencias en los patrones de distribución de la marca radioactiva entre los azúcares cuando se hicieron las incubaciones con los tejidos (eje y escutelo) unidos como embrión, o separados por disección (Figs. 14, 15 ).

En el eje embrionario "unido" se incrementa el porcentaje de marca en ribosa en comparación con el eje aislado, cuando se incuba en presencia de glucosa ( $^{14}\text{C}-6$ ), y de disacáridos cuando se suministra glucosa ( $^{14}\text{C}-1$ ), lo que sugiere la participación del escutelo en esta distribución (Fig.

14 ). Por otra parte, el escutelo "unido" manifiesta un incremento en ribosa marcada cuando se incuba en presencia de glucosa ( $^{14}\text{C}-1$ ), o glucosa ( $^{14}\text{C}-6$ ), perfil de distribución que contrasta con el determinado en el escutelo aislado, por lo que no se descarta la participación del eje embrionario en la modificación de este patrón (Figs. 14-15 ). Estos resultados sugieren que existe transporte de los metabolitos de la vía de las

pentosas y la glicolítica entre los dos tejidos, probablemente más activo del escutelo al eje embrionario.

Por otra parte se debe también considerar que el intercambio de metabolitos entre la vía glicolítica y el ciclo de las pentosas, permite a esta ruta elevar los niveles de ribosa sin modificar la carga reductiva, modulando únicamente la actividad de transaldolasas y transcetolasas. (Williams J.F. et al 1978).

Dentro de los mecanismos más importantes mediante los cuales se regula la actividad enzimática son:

- 1.- Control de la velocidad de síntesis por regulación de la transcripción o traducción (regulada o no hormonalmente).
- 2.- Control de la velocidad de degradación de la enzima.
- 3.- Control de la actividad por interacciones alostéricas con los metabolitos.
- 4.- Control de la actividad de la enzima por modificación química catalizada por enzimas, ejemplo: fosforilación - defosforilación, y
- 5.- El control de la actividad enzimática por interacciones físicas: proteína-proteína (Holzer, H. et al 1971). Dentro de este razonamiento, los inhibidores protéicos desempeñan una función dentro del esquema de regulación metabólica diferente a la estrategia de regulación propia de una secuencia de reacciones, ej.: inhibición por producto, sustratos, iones, carga energética, carga reductiva. En este ámbito podemos citar a los inhibidores de proteasas (Laskowski, M. et al 1980), al inhibidor de la alcohol deshidrogenasa de escutelo de maíz (Yiu-Kay, L. & Scandalios, J.G.

1982) y al de alfa amilasa (Buonocore, V. et al 1977). Los inhibidores de proteasas limitan la actividad enzimática evitando proteólisis excesiva (Laskowski, M. et al 1980). Durante la germinación, la actividad de alcohol deshidrogenasa en el escutelo de maíz es regulada por los niveles de un inhibidor protéico (Ho, D.T.H. et al 1975).

Dentro de esta estrategia, el inhibidor protéico detectado en eje embriionario, modularía la actividad de la G6PDH en las diversas etapas fisiológicas que comprenden la formación de la semilla; durante estas fases, la vía de las pentosas se involucra en diferentes interacciones metabólicas: en la embriogénesis, durante la división celular, la actividad biosintética se intensifica pasando por un período de baja actividad, al cesar la división celular en la madurez para incrementarse posteriormente durante la etapa crítica de la germinación.

El carácter protéico de estos inhibidores sugieren que además de la función reguladora de la actividad en el citoplasma se puede ejercer a este nivel un control genético, en cuanto a la síntesis de ese inhibidor, ya que algunas variedades de maíz parecen no tener el inhibidor, o no expresarlo en una condición ambiental determinada (germinación prematura, parte 2).



**PARTE B.- GERMINACION PREMATURA.**

El perfil de actividad que presenta la G6PDH durante la formación y maduración del grano muestra aspectos que revelan su posible participación dentro del fenómeno de Germinación Prematura.

Las determinaciones preliminares efectuadas durante el ciclo agrícola 1980 permitieron evaluar la actividad enzimática en este proceso (Figs. 23,24 ) durante un lapso que abarcó del trigésimo día después de la floración en las variedades H-30 y Tlaxcala (Fig. 23 ) y Criollo fertilizado y no fertilizado (fuente nitrogenada: sulfato de amonio)(Fig. 24), hasta la madurez fisiológica del grano (65 días después de la floración).

En H-30 y Tlaxcala (Fig.23 ) se observa una disminución en la relación de actividades enzimáticas escutelo/eje embrionario, a partir de la tercera muestra, que es la que marca el inicio de la germinación prematura. En las variedades criollas se observa una tendencia similar a la anterior con una disminución en la relación de actividades escutelo/eje embrionario en la segunda muestra. En ninguna de estas variedades se observó una influencia definitiva de la fertilización sobre la actividad enzimática.

De estos resultados (tabulados en la Fig.25 ) se sugiere que la relación de las actividades enzimáticas escutelo/eje embrionario es dependiente de la variedad más que del área de cultivo usada; ya que en el maíz criollo de Huamantla esta relación permanece baja, independientemente del sitio de cosecha: Ignacio Zaragoza, Municipio de Huamantla, Tlaxcala y Chapingo, Edo. de México.

Con estos indicios participamos en el experimento diseñado en el ciclo agrícola 1981.

El patrón de actividad se evaluó a partir del 25o. día después de la floración (etapa más temprana que en el ciclo agrícola anterior), tomándose muestras cada 15 días hasta la madurez fisiológica. Los resultados muestran que la actividad enzimática no es detectable en el eje embrionario de 25 días después de antesis (Fig, 26 ). Sin embargo, presenta una tendencia ascendente con un máximo a los 55 días coincidente con la aparición de la germinación prematura, la cual disminuye posteriormente en la madurez fisiológica.

Los granos de maíz de la primera muestra, en la que no se detectó la actividad enzimática en el eje embrionario, son capaces de germinar cuando se separan de la mazorca y se ponen en condiciones adecuadas para la germinación, sugiriendo que estos tejidos reciben los precursores para llevar a cabo la síntesis de ribosa del escutelo. Esta posibilidad es muy factible, ya que en escutelo está presente la G6PDH desde el estadio más inmaduro del embrión. Otra alternativa sería que en estos tejidos la vía de síntesis de pentosas estuviera regulada de tal forma que la ribosa se sintetizara a través de intermediarios de la vía glicolítica con la participación de las transcetolasas y transaldolasas (reacciones no oxidativas del ciclo de las pentosas, Fig. 2 ).

En el escutelo se observó durante la maduración un patrón semejante al

del eje embrionario, pero la actividad enzimática está presente a partir de la primera muestra y sufre fluctuaciones menores a pesar de que la actividad de la G6PDH en eje embrionario es la que puede correlacionarse con el brotamiento de los granos, y no la del escutelo, ya que la del escutelo se mantiene relativamente constante durante el proceso de formación del grano.

En las mediciones efectuadas durante la germinación en semillas maduras (Tablas 8, 9, 11), las variedades que presentaron germinación prematura en el experimento de campo (Criollo, Tlacamilco, H-139, Huamantla y Tlaxcala) no incrementan la actividad enzimática a las 6 horas de germinación. En cambio en las que no la presentan, como en la variedad Tlaxcala VS 22 E Chapingo 1979, el incremento en eje embrionario fue de aproximadamente 2.5 veces a las 6 horas. Al mismo tiempo, en esas variedades: las Criollas, H-139 y Huamantla no se encuentra actividad inhibitoria contra la G6PDH (Tabla 9). Más aún, Huamantla muestra una drástica disminución en la actividad enzimática a las 6 horas de germinación; sin embargo, en el escutelo de las 3 variedades susceptibles no se observa cambio significativo en el patrón enzimático.

Como la variedad Criollo de Huamantla presentó la mayor desviación al patrón mostrado por Tlaxcala VS 22 E (que se tomó como control normal), se sometió a análisis respirométricos (Tabla 10). Este análisis reveló bajos niveles de  $^{14}\text{CO}_2$ , eliminado al suministrar 1- $^{14}\text{C}$ -glucosa en comparación con el de Tlaxcala VS 22 E (Tabla 4), además no sufre el incremen-

to en  $\text{CO}_2$  respirado de  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -glucosa durante el pulso de 5 a 6 horas que presenta Tlaxcala VS 22 E. Como consecuencia, la relación C-6/C-1 se mantiene alta: 1.81 durante el pulso 0-1 hora, y 0.78 durante el pulso 5-6 horas sin que esto signifique una alta actividad del ciclo de las pentosas. El análisis de los carbohidratos solubles (Fig. 27) en esta variedad mostró una distribución totalmente diferente a la determinada en Tlaxcala VS 22 E (Fig. No. 12). En el criollo de Huamantla, la ribosa y sacarosa constituyen la marca predominante cuando se suministra  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -glucosa o  $6\text{-}^{14}\text{C}$ -glucosa, aunque en este último caso existen algunas diferencias del período 5-6 horas para ribosa con  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -glucosa y 0-1 horas con  $6\text{-}^{14}\text{C}$ -glucosa. En Tlaxcala VS 22 E en cambio, la ribosa únicamente se mostró marcada significativamente cuando se suministró  $6\text{-}^{14}\text{C}$ -glucosa en el período de 5-6 horas (Fig. No. 12).

En la agrupación de datos (Tabla 11) se observa una disminución en la relación de actividades enzimáticas escutelo/eje embrionario en todas las variedades expuestas a la zona de influencia del fenómeno de germinación prematura. Los valores altos de esta relación parecen correlacionarse con una ausencia de germinación prematura y los valores menores a 2.0 parecen estar sensiblemente asociados con este fenómeno, indicando una susceptibilidad de esas variaciones a la germinación prematura.

Con respecto a la presencia del inhibidor de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, el análisis de todas las diferentes variedades mostró que éste

solamente se presenta en aquellas variedades de maíz en las que el incremento en la actividad en eje embrionario es superior al 200%, variedades con un incremento menor a éste no lo presentan y muestran sensibilidad a la germinación prematura (Tabla 7), aunque no se descartan factores ambientales (temperatura, humedad, interacción con microorganismos, etc.). Estas observaciones deben considerarse aún de tipo preliminar, ya que se refieren a pocas variedades y faltan aún estudios más amplios que permitan confirmarlas y darles el peso adecuado del fenómeno de la germinación prematura.

BIBLIOGRAFIA.

Abeles, F.B.; R.E. Holm. (1966). Enhancement of RNA synthesis, protein — synthesis and abscission by ethylene. *Plant Physiol.* 44. 1337-1342.

Abeles, F.B. (1969). Abscission: Role of cellulase. *Plant Physiol.* 44. — 447-452.

Abeles, F.B.; G.R. Forrence. (1971). Abscission: control of cellulase secretion by ethylene. *Planta.* 97: 87-91.

Abu-Shakra, S.S. and T.M. Ching. (1967). Mitochondrial activity in germinating new and old soybean crop. *Sci.* 7: 115-118.

Addicott, F.T. and S.M. Wiatr. Hormonal controls of abscission: Biochemical and ultrastructural aspects. *En Plant growth regulation.* (Pilet, P.E. Editor) Springer-Verlag. U.S.A. (1977). pp. 249-257

Agrawal, P.K., and D.T. Canvin. (1971). The pentose phosphate pathway in relation total synthesis in the developing castor oil seed. *Plant Physiol.* 47: 672-675.

Alexander, D.E.; J.W. Lambert, and R.S. Dudley (1969). Breeding problems and potential of modified protein maize. *New approaches to breeding for improved plant protein.* Int. At. Energy Agency Vienna. 55-65.

Allsopp, A. The significance for development of water supply, osmotic relations and nutrition. In *Encycl. Plant Physiol.* (Lang, A. Editor). Vol. 15, part-1, pp 504-552. Springer verlag. New York. U.S.A. 1965.

Anderson, J.D. and A.A. Abdul-Baki. (1971). Glucose metabolism of embryos and endosperm from deteriorating barley and wheat seeds. *Plant Physiol.* 48: 270-272.

AP Rees, T. Assessment of the contributions of metabolic pathways to plant respiration. En The Biochemistry of plants. (Davies, D.D. Editor). Vol.2 Cap. I. pp. 1-29. Academic Press. U.S.A. (1980).

AP Rees, T. Integration of pathway of synthesis and degradation of hexose phosphates. En : The biochemistry of plants. (Preiss, J. Editor). Vol. 3. Cap. 1. pp. 1-43. Academic Press. U.S.A. (1980).

AP Rees, T. and H. Beevers. (1960). Plant Physiol. 35: 830-838.

AP Rees, T.; E. Blanch; D. Graham, and D.D. Davies. (1965). Plant Physiol. 40: 910-914.

Ashihara, H. and A. Komamine. (1974a). Enzyme and metabolite profiles of the pentose phosphate pathway in hypocotyls of Phaseolus mungo seedlings. Plant Sci. Lett. 2: 331-337.

Ashihara, H. and A. Komamine (1974b). Regulation of the activity of some enzymes of the pentose phosphate pathway in Phaseolus mungo. Z. Pflanzen Physiol. 74: 130-142.

Ashihara, H. and A. Komamine (1975). The function of the pentose phosphate. Pathway in Phaseolus mungo hypocotyls. Phytochemistry. 14: 95-98.

ura. (1977). Int. J. Biochem. 8: 461.

Avsopp, A. The signi-  
fications and nutritio-  
15. Part 1. pp. 504-5

for development of water supply, osmotic re-  
incicl. Plant. Physiol. (Lang, A. Editor). Vol.  
Springer-Verlag . U.S.A. (1965).

Bandarski, R.S. Movi-  
germination. En Movi-  
in phytochemistry. V

on of seed indole-3-acetic-acid reserves during  
on of reserves in germination. Recent advances  
. pp. 213-228. Plenum Press. U.S.A. (1980).



Bassham, J.A. (1973). Symp. Soc. Exp. Biol. 27: 461-483.

Bennet, P.A., and M.J. Chrispeels. (1972). De novo synthesis of ribonuclease and  $\alpha$ -1-3-glucanase by aleurone cells of barley. Plant Physiol. 49: 445-447.

Ben-Tal, Y. and J.E. Varner. (1974). An early response to gibberellic acid not requiring protein synthesis. Plant Physiol. 54: 813-816.

Berjak, P. (1868b). A study of some aspects of senescence in embryos of Zea mays L. Ph.D. Thesis, University of Natal.

Berlyn, G.P. Seed germination and morphogenesis. En Seed Biology, Editores. (Kozlowski, T.T. pp. 223-304. Academic Press. (1972).

Bernal-Lugo, I.; Becchy, R.N., and J.E. Varner. (1981). The response of barley aleurone-layers to gibberellic acid includes the transcription of new sequences. Biochem. and Biophysical Research Communications. 102: 617-623.

Bessler, E., and F.W. Slite. (1974). Salt and abscisic acid effects on -- 2.4.5.T. translocation weed. Sci. 22: 197-200.

Bewley, J.D. Dormancy breaking by hormones and other chemicals action at the molecular level. En : The plant seed development, preservation, and germination. (Rubenstein, I.; R.L. Phillips; Ch. E. Green; B. G. Gengenbach; Editores). pp. 219-230. Academic Press. U.S.A. (1979).

Bewley, J.D., and M. Black. Physiology and Biochemistry of Seeds. Vol. I. Springer-Verlag. New York. U.S.A. (1978).

Bhat, S.P.; and J.D. Padayatty (1975). Nature 256: 227-228.

Titulo

Bianchetti, R.; and M. P. Cornaggia (1965) *G. Bot. Ital.* 72: 370-382

Black, M. (1980/1981). The role of endogenous hormones in germination and dormancy. *Israel Journal of Botany*. 29: 181-192.

Bloom, B. and D. Stetten, J. R. (1953). Pathways of glucose catabolism. *J. Am. Chem. Soc.* 75: 5446

Bonner, J. , and J. E. Varner. *Plant Biochemistry*. Third Edition. 732- - 750. Academic Press. U.S.A. (1976).

Boulter, D. Biochemistry of storage protein synthesis and deposition in - the developing legume seed. (1981). *Advances in Botanical Research*. (Woolhouse, H. W. Editor). Academic Press. U.S.A.

Boyer, C. and J. Preiss. (1978b). *Carbohydrates. Res.* 61: 321-334.

Brenner, M. L.; B. Barr, and F. Barr. (1977). Correlation of genetic vivipary in corn with abscisic acid concentration. *Plant Physiol.* 59 (suppl) : 76.

Brodie, A. F. and F. Lipmann (1955). *J. Biol. Chem.* 212: 677-685.

Brohult, S., and E. Sandgren. Seed Protein. En "The Protein". (Neurath, H. and Bailey, K. Editores). Primera Edición. Vol. 2. Parte A. pp 487- - 512. (1954). New York.

Brooker, J. D.; C. P. Cheung; and A. Marcus. Protein synthesis and seed germination. En *The Physiology and Biochemistry of seed dormancy and germination*. (Khan, A. Editor). pp. 347-356. Elsevier/North-Holland. Biomedical Press. U.S.A. (1977).

Bruce, M.P.; Roos, E.E. Seed and seedling vigor. In Seed Biology. (Kozlowski, T.T. Editor). Vol. I. Capítulo 6. 313-387. Academic Press. U.S.A. - - (1972).

Bachowicz, J. (1974).<sup>111</sup> Nature. 249: 350-356.

Buonocore, V.; T. Petrucci; V. Silano. (1977). Wheat protein inhibitors of  $\alpha$ -amylase. Phytochemistry. 16: 811-820.

Burrell, M.M. and T. AP Rees. (1974). Physiol. Plant Pathol. 4: 489-496.

Burrows, W.J. and D.J. Carr (1970). Cytokinin content of sea seeds during their growth and development. Physiol. Plant. 23. 1064-1070.

Butt, V.S. and H. Beevers. (1961). Biochem. J. 80: 21-27.

Byrne, H.; N.V. Christu, D.P.S. Verma, and G.A. Mac Lachlan. (1975). Purification and characterization of two cellulases from auxin treated pea epicotyls. J. of Biol. Chem. 250: 1012-1018.

Cardini, C.E. and R.B. Frydman (1966). In Methods in enzymology (Edits. Neufeld E.F. and V. Ginsburg. Vol VIII (387-394) Academic Press. New York.

Clark, J.M., and R.L. Switzer. Experimental Biochemistry. 2nd. Edition. W.H. Freeman and Co. U.S.A. (1977).

Coe, E.H. and M.G. Neuffer. The Genetics of corn. In "Corn and Corn-improvement". (Sprague, G.F. Editor). pp.111-223. Am. Soc. Agric. U.S.A. (1977).

Cohen, J.D., and R.S. Bandurski. (1982). Chemistry and physiology of the bound auxins. Ann. Rev. of Plant Physiology. 33: 403-430.

Coalbaugh, R.C.; and T.C. Moore (1969) Apparent changes in rate of kaurene biosynthesis and the development of sea seeds. *Plant Physiol.* 44 :- 1364-1367.

Coulbaugh, R.C. and T.C. Moore. (1971). Localization of enzymes catalysing kaurene biosynthesis in immature seeds. *Phytochemistry*. 10: 2375-2400.

Crabtree, B. and D.J. Taylor. Thermodynamics and metabolism. En *Biochemical Thermodynamics*. (Jones, M.N. Editor). Chapter 11. Elsevier Scientific Publishing Company. U.S.A. (1979).

Cracker, L.E.; F.B. Abeles. (1969). Abscission; Role of abscisic acid. - - *Plant Physiol.* 44: 1144-1149.

Cherry, J. ; H.A. Lund; G.B. Earley. (1960). Effect to gibberellic acid - on growth and yield of corn. *Agron. J.* 52. 167-170.

Chen, D.; S. Sarid, and E. Katchalski (1968). *Agrochimica*. 12: 389-397.

Chen, D. and D.J. Osborne. (1970). *Nature*, 226: 1157-1160.

Cheung, C.P.; and R.J. Suvadnik (1978). *Nature* 271 : 357-358.

Ching, T.M. and R. Danielson. (1972). Seedling vigor and adenosine triphosphate level of lettuce seeds. *Proc. Association of official seeds analysts*. Vol. 62. 116-124.

Ching, T.M. and W.E. Kronstand. (1972). Varietal differences in growth potential, adenylate energy level, and energy charge of wheat. *Crop Science*. 12: 785-789.

Ching, T.M. ; S. Hedtke; M.C. Boulger, and W.E. Kronstad. (1977). Correlation of field emergence rate and seed vigor criteria in barley cultivars. *Crop. Sc.* 17: 312-314.

Chrispeels, M.J.; and J.E. Varner (1967). Hormonal control of enzyme synthesis—On the mode of action of gibberellic acid and abscisin in aleurone layers of barley. *Plant. Physiol.* 42: 1008-1016

Datta, K.; L. Marsh, and A. Marcus. (1983). Early growth of wheat embryonic axes and the synthesis of RNA and DNA. *Plant Physiol.* 72: 394-397.

Davey, J.E. and J. Van Staden. (1979). Cytokinin activity in Lupinus albus. IV. Distribution in seeds. *Plant Physiol.* 63. 873-877.

Davies, L.A., and F.T. Addicott. (1972). Abscisic acid correlations with abscission and with development in cotton fruits. *Plant Physiol.* 49: 644-648.

Determann, H.. Gel Chromatography. A Laboratory Handbook. Second Edition. Springer-Verlag. U.S.A. (1969).

Dommes, J. and C.V. De Walle. (1983). Newly synthesized mRNA is translated during the initial imbibition phase of germinating maize embryo. *Plant Physiol.* 73: 484-487.

Duffus, C.M. Carbohydrates Metabolism and Cereal Grain Development. In: Recent Advances in the Biochemistry of Seed. Laidman, D.L. and R.G. Wyn Jones (Editors). Academic Press. New York .U.S.A. (1979).

Dure, L.S. III, (1975). Seed formation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 259-278.

Erlandsson, G., S. Pettersson, and S.B. Svensson. (1978). Rapid effects - of abscisic acid on ion uptake in sunflower roots. *Physiol. Plant.* 43: 380-384.

Evins, W.H. (1971). Enhancement of polyribosome formation and induction of tryptophan-rich-protein by gibberellic acid. *Biochem.* 10: 4295-4303.

Eyster, W.H. (1931). Vivipary in maize. *Genetic.* 16: 574-590.

Fakan, S. and R. Deltour. (1981). Ultrastructural visualization of nucleolar organizer activity during early germination of *Zea mays* L. *Experimental Cell Res.* 135: 277-282.

Filner, P.; and J.E. Varner (1967). A test for de novo synthesis of enzyme: Density labelling with  $H_2^{18}O$  of barley alpha-amylase induced by gibberellic acid *Proc. Nat. Acad. Sci.* 58: 1520-1526

Fosket, D.E.; L.C. Morejohn, and K.E. Westerling. Control of growth by cytokinin: an examination of tubulin synthesis during cytokinin induced growth in cultured cells of Paul's Scarlet Rose. In *Metabolism and molecular activities of cytokinins.* (Guern, J. and Péaud-Lenoël, Editores), pp. 193-212. Springer-Verlag. (U.S.A.) (1982).

Fountain, D.W. and I.D. Bewley. (1976). Lettuce seed germination: modulation of pregermination protein synthesis by gibberellic acid, abscisic acid and cytokinin. *Plant Physiol.* 58: 530-536.

Galinat, W.C. (1971). The origin of maize. *Ann. Rev. of Genetics.* 447-478.

Gasking, P.; P.S. Kirkwood; J.R. Lenton; J. MacMillan and M.E. Radley (1980)-  
*Agric. Biol. Chem.* Vol. 44. 1589-1593.

Gastelum, R.F. Germinación prematura en maíz. Tesis. Colegio de Postgraduados. Chapingo. Edo. de México. (1981).

Gefter, M.L.; R.L. Russell (1969). Role of modification in tyrosine transfer RNA: a modified base affecting ribosome binding. *J. Mol. Biol.* 39: 145-157.

Gepstein, S. and I. Ilan. (1980). Evidence for the involvement of cytokinins in the regulation of proteolytic activity in cotyledons of germinating beans, *Plant and Cell Physiol.* 21: 57-63.

Gianazza, E.; V. Viglionchi; P.G. Righetti; F. Salamini, and C. Soave. — (1977). *Phytochemistry.* 16. 315-317.

↑ Tissue

Goldbach, H.; G. Michael. (1977). Abscisic acid content of barley grains during ripening as affected by temperature and variety. *Crop. Sci.* 16. - 797-799.

Goldsmith, M.H.M. (1977). The polar transport of auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 439-478.

González, N.C. (1976). Germinación de granos inmaduros en mazorcas de maíz. *Agronomía Tropical.* 26(A): 359-362.

Gordon, I.L. (1980). Germinability, dormancy and grain development. *Cereal Research Communications.* Vol. 8. 1: 115-129.

Gosling, P.G. and J.D. Ross. (1980). Pentose phosphate metabolism during dormancy breakage in *Corylus avellana* L. *Planta.* 148: 362-366.

Greenbaum. A.L.; K.A. Gamaa and P. McLean. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* 143: 617-663.

↑ T. H.

Greene, F.C. (1983). Expression of storage protein genes in developing wheat (Triticum aestivum L.), seeds. *Plant Physiol.* 71. 40-46.

Haberlandt, G.F.J. *Physiologische pflanzenanatomie*. 1st edit. Engelmann. Leipzig. (1884).

Hecker, M.; and H. Müller (1974). Investigations on properties of inhibitors of aminoacyl tRNA synthetases produced during germination of Agrostemma seeds. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 165; 419-428

Hedden, P.; J. Mac Millan, and B.O. Phinney. (1978). The metabolism of the gibberellins. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 29: 149-192.

Hernández-Tobías, A. (1979). Tesis Maestría en Ciencias. Facultad de Química. División de Posgrado. UNAM.

Higuchi, T., and M. Shimada. (1967). *Plant and Cell Physiol.* 8: 71.

Ho, D.T.H. Hormonal control of enzyme formation in barley aleurone layers - In: *Plant Molecular Biology* (Rubinstein, I.; R.L. Phillips, C.E. Green and B.C. Gegenback. Editores) pp. 217-240. Academic Press. U.S.A. 1979.

Ho, D.T.H. Hormonal and genetic regulation of  $\alpha$ -amylase in barley aleurone cells. In: *Genome organization and expression in plants.* (Leque, C. - J. Editor) pp 147-157. Plenum Press. U.S.A. (1980).

Ho, D.T.H.; and J.G. Scandalios (1975). Regulation of alcohol dehydrogenase in maize scutellum during germination. *Plant Physiol.* 56 : 56-59 .



Ho, D.T.H.; and J.E. Varner. (1974). Hormonal control of messenger ribonucleic acid metabolism in barley aleurone layers. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71 : - 4783-4786.

Ho, D.T.H. ; and J.E. Varner. (1978) <sup>try</sup> *Arch. Biochem. Biophys.* 187 : 441.

Holzappel, H.; A. Wild and R. Zerbe. (1983). Effects of kinetin and different light qualities on the content of carbohydrates. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 178. 297-306.

Holzer, H. and W. Duntze. (1971). Metabolic regulation by chemical modification of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 345-373.

Horecker, B.L.; P.Z. Smyrniotis, and J.E. Seegmiller. (1951). <sup>try</sup> *J. Biol. Chem.* 193: 383-396.

Horecker, B.L. and P.Z. Smyrniotis. (1952). *J. Am. Chem. Soc.* 74: 2123.

Horecker, B.L. and P. Z. Smyrniotis. (1953). *Biochim. Biophys. Acta.* 12: 98-102.

Horton, R.F. (1971). Stomatal opening: The role of abscisic acid. *Can. J. Bot.* 49: 583-585.

Hsu, F.C. (1979). Abscisic acid accumulation in developing seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 63: 552-556.

Humphreys, T. (1981). Sacrose- proton efflux from maize scutellum cells. *Phytochemistry.* (10).20: 2319-2323.

Hatchinson, J.B.; E.N. Greer, and C.C. Brett. (1948). Resistance of wheat to sprouting in the ear empire. *J. Exp. Agr.* 16: 23-32.

Ihle, J.N. and L. Dure III. The developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. *The Journal of Biological Chemistry.* 247: 5048-5055.

Ilan, I.; T. Gilad; L. Reinhold. (1971). Specific effects of kinetin on uptake of monovalent cation by sunflower cotyledons. *Physiol. Plant.* 24: 337-341.

Ingle, J.D. Beitz, and R.H. Hageman (1965) *Plant Physiol.* 39: 835-839.

Iyengar, S. and B. Pilo. (1981). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADP-linked malate dehydrogenase during posthatching development of brain of altricial birds. *Neurochem. Res.* 6: 67-76.

Jackson, D.F. and B.G. Coombe. (1966). Gibberellin-like substances in the developing apricot fruit. *Science.* 154: 277-278.

Jackson, G.A.D. (1968). Hormonal control of fruit development, seed dormancy and germination with particular reference to Rosa spp plant growth regulators. (Soc. Chem. Industry). Monogram 31: 127-156.

Jacobsen, J.V.; T.J. Higgins and J.A. Zwar. Hormonal control of endosperm function during germination. In: *The Plant seed: development, preservation and germination.* (Rabinstein, I.; R.L. Phillips; C.E. Green and B. G. Gengenbach, Editores). pp. 241-262. Academic Press Inc. U.S.A. (1979).

Jacobsen, J.V., and J.E. Varner. (1967). Gibberellic acid induced synthesis of protease by isolated aleurone layers of barley. *Plant Physiol.* 42: 1596-1600.

Jamerson, P.E.; J.A. Mc Wha, and G.J. Wriqth. (1982). Cytokinins and changes in their activity during the development of grains of wheat (Triticum aestivum L.) Z. Pflanzen Physiol. 106: 27-36.

Jendrisak, J. (1980). The use of  $\alpha$ -amanitina to inhibit in vivo RNA synthesis and germination in wheat embryos. J. Biol. Chem. 255: 8529-8533.

Jesko, T. and G. Vizarova. (1980). Changes in free endogenous cytokinins during transitory increased photosynthetic rate inhibited by formation of the first two whorls of nodal roots in Zea mays L. Photosynthetica. 14. 83-85.

Johri, B.M. Experimental embryology of vascular plants. Springer-Verlag. (1982).

Jones, R.A.; B.A. Larkins, and K.Y. Tsai. (1977b). Plant Physiol. 59. 733-737.

Jones, R.J., and E.A. Mansfield. (1970). Suppression of stomatal opening in leaves treated with abscisic acid. J. Exp. Bot. 21: 714-719.

Jones, R.L. (1969a). Gibberellic and the structure of barley aleurone cells I; changes during lag phase of  $\alpha$ -amilase synthesis. Planta. 85: 359-375.

Jones, R.L. (1969b). The fine structure of barley aleurone cells. Planta. 88: 73-80.

Jones, R.L. (1974). The gibberellins; their physiological role. Ann. Rev. Plant Physiol. 24: 571-598.

Jones, R.L., and I.D.J. Phillips. (1966). Organs of gibberellin synthesis in light-grown sunflower plants. Plant Physiol. 41: 1381-1386.

Joshi, S. M.L. Lodha, and S.L. Metha (1980) Regulation of starch biosynthesis in normal and opaque-2 Maize during endosperm development .Phytochemistry - 19 :2305-2309.

Kanamori, I.; H. Ashihara, and A. Komamine. (1979). Changes in the activities of the pentose phosphate pathway and pyrimidine nucleotide biosynthesis during the growth of Vinca rosea cells in suspension culture. Z. Pflanzenphysiol. 93: 437-448.

Katz, J.B.; R. Landau, and G.E. Bartsch. (1966). The pentose cycle, triose phosphate isomerization and lipogenesis in rat adipose tissue. J. Biol. Chem. 241: 727-740.

Key, J.L.; N.M. Baentf, and C.Y. Lin. (1967). RNA, and protein biosynthesis and the regulation of cell elongation by auxin. Ann. New York Acad. Sci. 144: 49-62.

Khan, A.A.. Plant growth substances. (Carr, D.J. Editor). pp. 207-215. Springer-Verlag. U.S.A. (1972).

Khan, A.A. (1975) Primary preventive and permissive roles of hormones in plant systems. The botanical Review. 41 (4): 391-419.

Khan, A.A. and C.E. Heit.(1968). Selective effect of hormones on nucleic acid metabolism during germination of pear embryos. Biochem. J. 113: 707-712.

Kiesselbach, T.A. The Structure and reproduction of corn. pp. 12-13. University of Nebraska Press. U.S.A. (1980).

Kikuta, Y. , and L.C. Erickson. (1969). Metabolism of glucose in relation to lipid synthesis in the fruit of Persea americana Mill. Plant Cell Physiol. 10: 563-575.

- King, R.W. (1976). Abscisic acid in developing wheat grains and its relationship to grain growth and maturation. *Planta*. 132: 43-51.
- 
- King, R.W. (1976). Abscisic acid in developing wheat grains and its relationship to grain growth and maturation. *Planta*. 132. 213-251.
- 
- Klämbt, D. Cytokinin and cell metabolism . En Plant growth regulation. (Pilet, P.E. Editor). pp. 154-180. Springer-Verlag . U.S.A. (1977)
- Konzak, C.F. Genetic control of the content, amino acid composition, and processing properties of proteins in wheat. En Advances in Genetics. - - (Caspari, E.W. Editor). Vol. 19. pp. 408-546. Academic Press. U.S.A. (1977).
- Kornberg, A. and B.L. Horecker. Glucose-6- phosphate dehydrogenase. En Methods in enzymology. (Colowick, S.P. and N.O. Kaplan, Editores). Vol. I. pp. 320-323. Academic Press. U.S.A. (1954).
- Kovacs, M.I.P., and G.M. Simpson. (1976). Dormancy and enzyme levels in seeds of wild oats. *Phytochemistry*. 15: 445-458.
- 
- Kramer, H.H.; P.L. Pfahler, and R.L. Whistler. (1958) Gene interactions in maize affecting endosperm properties. *Agron. J.* 50 (207-210).
- 
- Kulaeva, O.N. Cytokinin action on transcription and translation in plants. En Metabolism and molecular activities of cytokinins. (Guern, J. and C. Péaud-Lenoël, Editores). pp. 218-227. Springer-Verlag. U.S.A. (1981).
- 
- La Croix, L.J., and A.S. Jaswal. (1967). *Plant Physiol.* 42; 479-480.
- 
- Lampe, L. (1931) A microchemical and morphological study of the developing endosperm of maize. *Bot. Gaz.* 91: 337-376.

Lang, A. Effects of some internal and external conditions on seed germination. En Encyclopedia of Plant Physiology. (Ruhland, W. Editor). Vol. - XVI. pp. 848-893. Sringer. Berlin. (1965).

Larque-Saavedra, A., and R.L. Wain. (1974). Abscisic acid levels in relation to drought tolerance in varieties of Zea mays L. Nature. 251: 716-717.

Larque-Saavedra, A., and R.L. Wain. (1976). Studies on plant growth regulations substances. XLII. Abscisic acid as a genetic character related to drought tolerance. Ann. Appl. Biol. 83: 291-297.

Laskowski, M. and I. Kato. (1980). Protein inhibitors of proteinases. Ann. Rev. Biochem. 49: 593-626.

Lea, P.J. and K.W. Joy. Aminoacids interconversion in germinating seeds. En Advances in Phytochemistry. Vol. 17 Mobilization of reserves in germination. 77-110.(Nozzolillo, E.; Lea, P.J., and Loewus, F.A. Editores). Plenum Press. New York. (1983).

Lee, Y.; and T. Takahashi. (1966). An improved colorimetric determination of aminoacid with the use of ninhydrin. Analytical Biochemistry. 14: 71-77.

Leloir, L.F. M.A.R. de Fekete and C.E. Cardini (1961) .J.Biol.Chem.232:636-641

Letham, D.S. and E.G. Bollard. (1961). Stimulants of cell division in developing fruits. Nature. 191: 1119-1120.

Letham, D.S. (1963). Zeatin, a factor inducing cell division isolated from Zea mays. Lite. Sci. 2: 569-573.

Letham, D.S. and L.M.S. Paln. (1983). Ann. Rev. of Plant Physiol. 34: 163-197.

Levy, H.R. Glucose-6-phosphate dehydrogenases. En Advances in Enzimology. (Meister, A. Editor). Vol. 48. pp. 97-192. John Wiley and Sons. U.S.A. (1979).

Lewis, B.A.; F. Smith. X Sugars and derivates. En Thin Layer Chromatography. (Stahl, E. Editor). pp. 807-837. Springer-Verlag. U.S.A. (1969).

Lewis, L.N. and J.E. Varner. (1970). Synthesis of cellulase during abscission of Phaseolus vulgaris leaf explants. Plant Physiol. 46: 194-199.

Libbert, E; S. Wichner; V. Schiewer; H. Risch, and W. Kaiser. (1966). The influence of epiphytic bacteria on auxin metabolism. Planta. 68: 327-334.

Little, Ch. A. ; D.C. Eidt. (1968). Effects of abscisic acid on budbreak and transpiration in woody species. Nature. 220: 498-499.

Loveys, B.A. (1977). The intracellular location of abscisic acid in stressed and non-stressed leaf tissue. Physiol. Plant. 40: 6-10.

Lowe, L.B.; S.K. Ries. (1972). Effects of enviroments on the relation between seed protein and seedling vigor in wheat . Can. J. Plant Sci. 42: 157-164.

Lowry, O.H.; N.J. Rosenbrough; A.L. Farr and R.J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol Chem. 193: 265-275.

Lunn, G. And E. Madsen. (1981). ATP-levels of germinating seed in relation to vigor, Plant. Physiol. 53: 164-169.

MacLeod, A.M., and G.H. Palmer. (1966). The embryo of barley in relation to modification of the endosperm. *J. Int. Brew.* 580-589.

---

Mac Millan, J. Hormonal regulation of development. Vol. I. Molecular Aspects of Plant Hormones. Springer-Verlag U.S.A. (1980).

---

Malik, C.P., and S.P. Kaur. (1980). Changes in levels of auxin and inhibitor during seed development in okra (Abelmoschus osculentus L.(Moench)). *The Plant Biochemical Journal*. Vol. 7. 1: 5-14.

---

Mangelsdorf, D.C. (1923). The inheritance of defective seeds in maize. - *J. Hered.* 14: 115-119.

---

Mangelsdorf, P.C. (1930). The inheritance of dormance and premature germination in maize. *Genetics.* 15: 462-494.

---

Mans, R.J.; Ch. O. Gardner, Jr., and T.J. Walter. Selective transcription and processing in the regulation of plant growth. *En Molecular Biology of Plant.* (Rubenstein, I.; R.L. Phillips, Ch. E. Green, and B. G. Gengenbaon. pp 165-195. Academic Press (1979). U.S.A.

---

Mansfield, T.A.; W.J. Davies. (1981). Stomata and stomatal opening mechanisms. *En The physiology and biochemistry of drought resistance in plants* (Paleg, L.G.; D. Aspinall, Editores). pp. 314-346. Academic Press. U.S.A.

---

Marcus, A. and J. Feeley, (1966). Ribosome activation and polysome formation in vitro: requirement for ATP. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 56: 1770-1777.

---

Marcus, A. ;S.Spiegel, and J.D.Brooker. In Control Mechanism in Development. Meints, R.H. and E.Davies. Editores. pp 1-19 Plenum Publishing Corp. U.S.A. (1975)



Marcus, A.; and J. Velasco (1960) J. Biol Chem. 235:503-

Marrach, I. and, A.M. Mayer. (1974). Permeability of seed coats., to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. Plant Physiol. 54: 817-820.

Mayer, A.M. Metabolic control of germination. The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. (Khan, A.A. Editor) pp. 357-384. Elsevier/North-Holland. Biomedical Press. U.S.A. (1977).

Mayer, A.M.; I. Marbach. Biochemistry of the transition from resting to germinating state in seeds. University Israel. (1980).

Mayer, A.M.; A.P. Mayber, and N. Krishmaro. (1966). Properties and changes of glucose 6-phosphate dehydrogenase in germinating lettuce seeds. — Plant and Cell Physiol. 7: 25-33.

Mayer, A.M.; Mayber, A.P. The germination of seeds. III Ed. Pergamon Press U.S.A. (1982).

Mazus, B.; T. Brodniewics-Procha. (1976). Acta Biochim. Polonica. 23. 261-267.

Mazús, B.; B. Szurmark, and J. Buchowicz. (1980). Phosphorylation in vitro and in vivo of the wheat embryo RNA polymerase II. Acta Biochim. Polon. 27: 9-19.

Mc Daniel, S.; J.D. Smith, and H.J. Price. (1977). Response of viviparous mutants to abscisic acid. Maize Genet. Newsl. 51: 85-86.

Mertz, E.; O. Nelson, and L.S. Bates. (1964). Mutant gene that changes — protein composition and increases lysine content of maize endosperm. — Science. 145: 279-280.

Mifflin, B.J. and P.R. Shewry. Seed storage protein. Genetics, synthesis, - accumulation and protein quality. En Nitrogen and carbon metabolism. Proceedings of a symposium on the physiology and biochemistry of plant productivity. (Bewley, J.D. Editor). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. (1981). The Netherlands.

Milborrow, B.V. and D.R. Robinson. (1973). Factors affecting the biosynthesis of abscisic acid. J. Ex. Bot. 24: 537-548.

Milborrow, B. (1974). The chemistry and physiology of abscisic acid. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 259-307.

Milborrow, B.V. Abscisic acid and other hormones. En The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. (Paeleg, L.G.; D. Aspinall, Editores), pp. 347-388. Academic Press. U.S.A. (1981).

Miller, C.O.; F. Skoog; M.H. Von Saltza and F.M. Strong. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. J. Am. Chem. Soc. 77: 1392.

Miranda, C.S. (1977). Evolución de cuatro caracteres de maíz (Zea mays L.) Agrociencia. 28: 73-86.

Mitchell, B.; C. Armstrong; M. Black, and J. Chapman. Physiological aspects of sprouting and spoilage in developing Triticum aestivum L. (wheat) grains in seed production. (P.D. Hebblethwaite, Editor). 329-356. Butterworths. (1980). U.S.A.

Mittelheuser, C.J. and R.F.M. Van Steveninck. (1969). Stomatal closure - and inhibition of transpiration induced by (RS)-abscisic acid. Nature. 221: 281-282.

- Miyamoto, T. and E.H. Everson. (1958). Biochemical and Physiological studies of wheat seed pigmentation. *Agr. J.* 50 (733-734).
- Moore, R.P. Effects of mechanical injuries on viability. En: Viability of seeds. (E.H. Roberts, Editor). 94-113. Syracuse University Press. (1972.) - U.S.A.
- Moore, T.C.; P.R. Ecklund. Gibberellins and plant growth. (Krishnamoorthy, H.N. Editor). pp. 145-182. Wiley Eastern. New Delhi. (1975).
- Moore, T.C. Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. Springer-Verlag. U.S.A. (1979).
- Morré, D.J. (1968). Cell wall dissolution and enzyme secretion during leaf abscission. *Plant Physiol.* 43. 1545-1549.
- Mory, Y.Y.; D. Chen, and S. Sarid. (1975). De novo biosynthesis of deoxyribonucleic acid polymerase during wheat embryo germination. *Plant Physiol.* 55: 437-442.
- Mounla, R.K.; G. Michael. (1973). *Physiol. Plantarum.* 29: 274-276.
- Mozer, T.J. (1980) Control of protein synthesis in barley aleurone layers by the plant hormones gibberellic acid and abscisic acid. *Cell.* 20 :479-485.
- Müntz, K.; H. Baulein; R. Basgüner, R. Manteuffel; M. Püchel, P. Schmidt, and V. Wobas. (1981). Regulation von biosynthese und akkumulation der reserve proteine während der entwicklung pflanzlicher samen. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 176: 401-422.
- Murphy, J.B.; T.L. Noland. Temperature effects on seed inhibition and leakase mediated by viscosity and membranes. *Plant Physiol.* 69: 428-431. (1982).

Mutnes, K.; L. Engelbrecht. (1961). Kinetin-induced directed transport of substances in excised leaves in the dark. *Phytochemistry*. 1. 58-62.

Muto, S. and I. Vritani. (1972). Inhibition of sweet potato glucose-6-phosphate dehydrogenase by  $\text{NADPH}_2$  and ATP. *Plant and Cell Physiol.* 13: 377-380.

Nelson, O.E. (1970). Improvement of plant protein quality in improving plant protein by nuclear techniques. *Int. At. Energy Agency Vienna*. 43-51.

Neuffer, M.G.; L. Jones; M.S. Zuber. *The mutants of maize*. *Crop. Sci. - Soc. Am. U.S.A.* (1968).

Newsholme, E.A. and C. Start. Introduction to regulation in metabolic pathways. *En Regulation in metabolism*. Chapter 1. John Wiley and Sons. U.S.A. (1973).

Nickerson, N.H. (1959). Sustained treatment with gibberellic acid of five different kinds of maize. *Ann. Mo. Bot. Garden*. 40: 19-37.

Nickerson, N.H. and T.N. Emblar. (1960). Studies involving sustained treatment of maize with gibberellic acid; further notes on responses of races. *Ann. Mo. Bot. Garden*. 47: 227-242.

Nilsson-Ehle, H. (1914). Zur kenntnis der mit der keimungs-physiologie des weirens in zusammenhang stehenden inneren faktoren. *Z. Pflanzenzucht*. 2: 153-187.

Nilsson-Ehle, H. (1914). Zur Kenntnis der mit der keimungs-physiologie des weirens in zusammenhang stehenden inneren faktoren. *Z. Pflanzenzücht.* 2: 153-187. (An volkmar stoy and kerstin sundin. (1975). Effects of growth regulatin substances in cereal seed germination. *Cereal Research Communications*. Vol.4 . 2: 157-163.

Nowacki, J. and R.S. Bandurski. (1980). Myo-inositol esters of indole-3-acetic acid as seed auxin precursors of Zea maysL. Plant Physiol. 65: 422-427.

Obendorf, R.L. and A. Marcus. (1974). Rapid increase in adenosine 5'-triphosphate during early wheat embryo germination. Plant Physiol. 53: 779-781.

Okamoto, K. and T. Akazawa. (1979). Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. Plant Physiol. 336-340.

Ortega-Delgado, M.L.; C.C. Rodríguez-Coquíz. (1979). Estudio de carbohidratos en variedades mexicanas de frijol (Phaseolus vulgaris y Phaseolus coccineus L.). Agrociencia. 37: 33-49.

Osborne, J.D.; R. Sharon, and R. Ben-Ishai. (1980/1981). Studies on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye (Secale cereale). Israel Journal Botany. 259-272.

Osborne, T.B. (1895). J. Am. Chem. Soc. 17. 539-567.

Osborne, T.B. (1924). Vegetable protein. Longmans Green. London. pp154.

Ozbun, J.L., J.S. Hawker, E. Greenberg, C. Lammel and J. Preiss (1973) Plant Physiol 51 (1-5).

Payne, P.I. (1976). The long-lived messenger ribonucleic acid of flowering plant seeds. Biol. Rev. 51: 329-363.

Payne, P.I. (1977). Synthesis of poly A-rich RNA in embryos of rye during imbibition and early germination. Phytochemistry. 16: 431-434.

Pernollet, J.C. (1978). Protein bodies of seeds: ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. *Phytochemistry*. 17: 1473-1480.

Peumans, W.J. and A.R. Carlier. (1981). Loss of protein synthesis activity in ageing wheat grains: lesions in the initiation process and mRNA degradation. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. 176: 384-395.

Pilo, B. and S. Iyengar. (1977). Studies on the relationship of post-hatching development of different areas of the brain with the duration of nestling period in the young ones of altricial birds. I. Changes in brain weight, protein content and nucleic acids. *PAVO*. 15: 130-141.

Pilo, B. and S. Iyengar. (1981). Changes in lipid content during the post-hatching development of the brain in altricial birds. *Histochem. J.* 13: 453-460.

Porter, N.G. (1981). The directional control of sucrose and asparagine transport in lupin by abscisic acid. *Physiol. Plant*. 53: 279-284.

Preiss, J. and C. Levi. Starch biosynthesis and degradation. In: *The biochemistry of plants* Vol. 3 Pgs. 371-423. Edit. Preiss J. Academic Press. New York. 1980.

Pryke, J.A. and T. A.P. Rees (1976). *Planta*. 132: 270-284.

Pryke, J.A. and T.A. Rees. (1977). The pentose phosphate pathway as a source of NADPH for lignin synthesis. *Phytochemistry*. 16: 557-560.

Quebedeaux, B., P.B. Sweetser, and J.C. Rowell. (1976). Abscisic acid. Levels in soybean reproductive structures during development. *Plant Physiol.* 58: 363-366.

Rabson, R.; R.J. Mans; and G.D. Novelli. (1961). Arch. Biochem. Biophys. 93: 555-562.

Radin, J.W. and R.C. Ackerson. (1982). Does abscisic acid control stomatal closure during water stress? What's new. Plant Physiol. 13: 9-12.

Radley, M. (1967). Site of production of gibberellin-like substances in germinating barley embryos. Planta. 75: 164-171 .

Raghaven, J. Experimental embryogenesis in vascular plants. Academic Press. U.S.A. (1976).

Raja-Kumar, N. and P.G. Rao. (1980). <sup>14</sup>C-incorporation into sugars and changes in starch during feminization of castor (Ricinus communis) as influence by kinetin and morphactin. Can. J. Bot. 58. 388-391. (1980).

Ramagopal, S.; and A. Marcus. (1979) RNA synthesis in growing and stationary cells at a culture of scarlet rose. Disproportionate synthesis of ribosomal subunits in the stationary state. J. Cell Physiol. 98: 603-612

Randolph, L.F. (1936). Developmental morphology of the caryopsis in maize. J. Agric. Res. 53: 881-916.

Raschke, K. The stomatal turgor mechanism and its responses to CO<sub>2</sub> and abscisic acid: observations and a hypothesis. In Regulation of cell membrane activities in plants. (Marré, E.; O. Cefferi, O., Editores). pp. 173-183. Biomed. Press. Elsevier/North Holland. (1977).

Reid, P.D.; H.G. Strong; F. Lew; L.N. Lewis. (1974). Cellulase and abscission in the red kidney bean (Phaseolus vulgaris). Plant Physiol. 53: - - 732-737.

Riov, J. (1974). A polygalacturonase from citrus-leaf. Explants. Plant Physiol. 53: 312-316.

Roberts, E.H. (1969). Seed dormancy and oxidation processes. En Dormancy and survival. (Woolhouse, H.W., Editor). Cambridge, Univ. Press. Symp. Soc. Expl. Biol. 23: 161-192.

Roberts, E.H. Oxidative processes and the control of seed germination. En "Seed Ecology". (Heydecker, W. Editor). pp. 189-218. Butterworths. London. (1973).

Roberts, E.H.; F.H. Abdalla, and R.J. Owens. (1967). Nuclear damage and the ageing of seeds with a model for seed survival curves. Symp. Soc. — Exp. Biol. 21: 65-100.

Robertson, D.S. (1955). The genetics of vivipary in maize. Genetics. 40: 745-760.

Robertson, D.S. (1961). Linkage studies of mutants in maize with pigment deficiencies in endosperm and seedling. Genetics. 46: 649-662.

Robichaud, C.S., and I. Sussex. (1979). An analysis of abscisic acid relations in embryos of a viviparous mutant of Zea mays plant. Physiol. Suppl. 63: 36-

Robichaud, C.S.; J. Wong, and I.M. Sussex. (1980). Control of in vitro — growth of viviparous embryo mutants of maize by abscisic acid. Dev. Genet. 1: 325-330.

Rood, S.B.; R.P. Pharis; M. Koshioka, and D.J. Major. (1983). Gibberellins and heterosis in maize. I. Endogenous GA-like substances. Plant Physiol. 71: 639-644.



Rood, S.B.; T.J. Blake, and R.P.P. Pharis. (1983). Gibberellins and heterosis in maize. II. Response to gibberellic acid and metabolism of  $^3\text{H}$  gibberellin . Plant Physiol. 71: 645-651.

Russo, S.F.; Holzman, T. (1977). The activity of trypsin. Journal of Chemical Education. 54: 60-61.

Sánchez de Jiménez, E.; R. Aguilar, and S. López. (1981). Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 99. 2: 329-363.

Sasaki, K. and M. Sugita. (1982). Protein kinase associated with chromatin and changes, in substrate-specificity during germination of wheat seeds. Physiol. Plant. 56: 148-154.

Sass, J.E. Vegetative morphology. En Corn and corn improvement. (Sprague, G.F. Editor). pp. 63-67. Academic Press. U.S.A. (1955).

Sato, S. and T. Asah. (1975). Biochemical properties of mitochondrial membrane from dry pea seeds and changes in the properties during imbibition. Plant Physiol. 56: 816-820.

Schopfer, P.; D. Bajracharya and C. Plachy. (1979). Control of seed germination by abscisic acid. Plant Physiol. 64: 822-827.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

Dirección General de Economía Agrícola.

"Anuario Estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos" pp.166-170 (1979).

Sen, S., and D.J. Osborne. (1974). *J. Exp. Bot.* 25: 1010-1019.

Sen, S.; P.I. Payne, and D.J. Osborne (1975). Early Ribonucleic acid synthesis - during the germination of rye (Secale cereale) embryos and the relationship to early protein synthesis. *Biochem. J.* 148: 381-387.

Sen, S. and D.J. Osborne. (1977). Decline in ribonucleic acid and protein synthesis with loss of viability during the early hours of inhibition of rye Secale cereale L. embryos. *Biochem. J.* 166: 33-38.

Shannon, J.C. (1972) Movement of  $^{14}\text{C}$ -labelled assimilates into kernels of - Zea mays L. - Pattern and rate of sugar movement. *Plant Physiol.* 49: 198-202.

Shannon, J.C. and C.T. Dougherty (1972) *Plant Physiol.* 49: 203-206.

Shreve, D. and H.R. Levy. (1980). Kinetic mechanism of glucose-6-phosphate dehydrogenase from the lactating rat mammary gland. *J. Biol. Chem.* 255: 2670-2677.

Sihon, D.A.; A. Richmond, and Y. Vaadia. (1981). On the synthesis of gibberellins in roots. *Phytochemistry.* 6: 1101-1105.

Simmonds, J.A. and G.M. Simpson. (1971). Increased participation of pentose phosphate pathway in response to after ripening and gibberellic acid treatment in caryopses of Avena fatua. *Can. J. Bot.* 49: 1833-1840.

Singh, R. and B.O. Julians. (1977). Free sugars in relation to starch accumulation in developing rice grain. *Plant Physiol.* 59: 417-421.

Singh, R.; J. Kaur; A.K. Arya, and I.S. Bhatia. (1981). Accumulation of starch, protein and the activities of invertase and sucrose ADP (UDP) -- glycosyl transferase in developing Sorghum vulgare grains. Biochem. - - Physiol. Pflanzen 176: 606-613.

Smith, A.R. and J. Van Staden. (1978). Changes in endogenous cytokinin levels in kernels of Zea mays L. during imbibition and germination. J. Exp. Bot. 29: 1067-1075.

Smith, J.D.; S. Mc Daniel, and S. Lively. (1978). Regulation of embryo - growth by abscisic acid in vitro. Maize Genet. Newsl. 52: 107-108.

Soave, C.; N. Suman; A. Viotti; and F. Salamini. (1978). Linkage relationships between regulatory and structural genes loci involved in zein synthesis in maize. Theor. Appl. Gen. 52. 263-267,

Soave, C.; A. Viotti; N. Difunso, and F. Salamini. (1979). Maize prolamin; synthesis and genetic regulation (En; Seed protein improvement in cereals and grain legumes). Vol. II. pp 165-173. IAEA. Viena.

Sondheimer. E.; D.S. Tzou and E.C. Calson. (1968). Abscisic acid levels and seed dormancy. Plant Physiol. 43: 1443-1447.

Spiegel, S. and A. Marcus. (1975). Polyribosome formation in early wheat embryo germination independent of either transcription or poly adenylation. Nature. 256: 228-230.

Spiegel, S.; R.L. Obendorf, ; and A. Marcus. (1975). Plant. Physiol. 56: 502-507.

Stein, O.L. and H. Quastler. (1963). The use of tritiated thymidine in the study of tissue activation during germination in Zea mays. Amer. J. Bot. 50: 1006-1011.

Stillwell, W. and P. Hester. (1983). Kinetin increases water permeability of phosphatidylcholine lipid bilayers. *Plant Physiol.* 71: 524-530.

Stitt, M. and T. AP Rees. (1978). *Phytochemistry.* 17: 1251-1256.

Stoddard, J.L.; H. Thomas and A. Robertson. (1973). *Planta* 112: 309-321

Stoy, V. and K. Sundin (1976). Effects of growth regulating substances in cereal seed germination. *Cereal Research Communications.* Vol. 4. 2: 157-163.

Sussex, I. Dormancy and development in dormancy and developmental arrest. (Clutter, M. Editor). pp. 297-301. Academic Press. U.S.A. (1978).

Sussex, I.; M. Clutter and V. Walbot. (1975). Benzyladenine reversal of abscisic acid inhibition of growth and RNA synthesis in germinating bean axex. *Plant Physiol.* 56: 575-578.

Sutcliffe, J.F. and R. Sexton. Structure and function of primary root tissues. (Kolk, J. Editor). pp- 203-219. Veda. Bratislava. 1974

Tanaka, A. Yamaguchi, J. Componentes de materia seca, componentes del rendimiento y rendimiento del grano de maíz. Centro de Botánica. Colegio de Postgraduados Chapingo. Edo. de México. II reimpresión. (1981).

Thomas, J.V.H.; J.V. Jacobsen, and J.A. Zwar. (1982). Gibberellic acid and abscisic acid modulate protein synthesis and mRNA levels in barley aleurone layers. *Plant molecular Biology*. 1: 191-215.

Trewavas, A. Nuclear-phosphoproteins in germinating cereal embryos and their relationship to the control of mRNA synthesis and the onset. En the biochemistry of cereals. (Laidman, D.L. and Wyn Jones, Editores). pp. 175-208. Academic Press. U.S.A. (1979).

Turner, J.F. and D.H. Turner. The regulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. En : The Biochemistry of plants. (Davies, D.D. Editor). Vol. 2. págs. 279-316. Academic Press. U.S.A. (1980).

Valentini, G.; C. Soave, and E. Ottaviano. (1979) .Chromosomal location - of zein genes in maize .*Heredity*. 42: 33 - 40 .

Van de Walle C.; G. Bernier; R. Deltour, and R. Bronchart. (1976). Sequence of reactivation of ribonucleic acid synthesis during early germination of the maize embryo. *Plant Physiol*. 57: 632-639.

Van Staden, J. (1981). Cytokinins in germinating maize caryopses I. Transport and metabolism of 8(<sup>14</sup>C)t-zeatin applied to the endosperm. *Plant Physiol*. 53: 269-274.

Van Staden, J. (1981). Cytokinins in germinating maize caryopses. II. Transport and metabolism of 8(<sup>14</sup>C)t-zeatin applied to the embryonic axis. *Plant Physiol*. 53: 275-278.

Varner, J.E.; and Ho, D.T.H. The role of hormones in the integration of seed -  
ling growth. In: The Molecular Biology of Hormone Action. pp.173-194. Papacons-  
tantinou, J. (Edit.) Academic Press, New York, U.S.A. (1976).

Veldstra, H. (1944). Research on plant growth substances. V. Relation be  
tween chemical structure and physical activity. VI. Contemplation on pla-  
ce and mechanism of the action of the growth substances. Enzymologia. 7:  
137-163.

Vigil, E.L. and M. Ruddat (1973). Effect of gibberellic acid and actino-  
mycin D on the formation and distribution of rough endoplasmic reticulum  
in barley aleurone cells. Plant Physiol. 51: 549-558.

Vreugdenhil, D. (1983). Abscisic acid inhibits phloem loading of sucrose.  
Physiol. Plant. 57: 463-467.

Walerych, W.; A.F. Kijowska, R. Czapara, ; B. Szurmak, ; B. Mazúś, and J. Buchowicz (1982)  
Isolation of RNA polymerase II stimulatory protein from wheat germ chromatin  
Phytochemistry 21 (1495-1499).

Walton, D.C. (1980). Biochemistry and physiology of abscisic acid. Ann.  
Rev. Plant Physiol. 31: 453-489.

Warburg, O.; W. Christian, and A. Griese. (1935). Biochem. Z. 282: 157.

Warburg, O. and W. Christian. Biochem. Z. 287: 291- (1936).

Wareing, P.F. and A.K. Seth. (1967). Ageing and senescence in the whole -  
plant. Symp. Soc. Exp. Biol. 21: 543-558.

Wareing, P.F.; R. Horgan; I.E. Henson, and W. Davies. Cytokinin. Relation in the whole plant. En Plant Growth Regulation. (Pilet, P. Editor) pp. 147-153. (1977).

Weber, E.J. Corn kernel modification. En Recent advances in Phytochemistry. The resource potential in Phytochemistry. Vol. 14. Cap. 5 pp. 97-137. Plenum Press. U.S.A. (1980).

Weeks, D.P. and A. Marcus. (1971). Preformed messenger of quiescent wheat embryos. Biochim. Biophys. Acta. 232: 671-684.

West, C.A.; Biosynthesis of gibberellins. In: Biosynthesis and its control - in plants. (Milborrow, B.V. Editor) pp. 143-169. Academic Press. London - (1973).

and P.E. Granum. (1980). An absolute method for protein determined on difference in absorbance at 235 and 280 nm. Analyt. 109: 156-159.

Wielga Wasilewska, and K. Kleczkowski. RNA synthesis in germinating seeds under hormonal control. En Plant growth substances 1973. pp. 593-598. Kurokawa Publishing Co. Japan. (1974).

Williams, J.F.; M.C. Clark; P.F. Blackmore. (1978). The fate of  $^{14}\text{C}$  in glucose 6-phosphate synthesized from  $1\text{-}^{14}\text{C}$  ribose 5-phosphate by enzymes of rat liver. Biochem. J. 176: 241-256.

Williams, P.M., J.W. Bradbeer; P. Gaskin, and J. Mac Millan. (1974). Studies in seed dormancy VIII. The identification and determination of gibberellins  $A_1$  and  $A_9$  in seeds of Corylus avellana L. Planta. 117: 101-108.

Wiltbank, W.J.; A.H. Kreadorn. (1969). Determination of gibberellins in ovaries and young fruits of navel oranges and their correlation with fruit growth. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 94: 195-201.

Wright, S.T.C. (1969). An increase in the "inhibitor-  $\beta$  " content of detached wheat leaves following a period of wilting. *Planta.* 86: 10-20.

Yiu-Kay, L. and J.G. Scandalios. (1982). Purification and characterization of an endogenous inhibitor of alcohol dehydrogenase from maize root. *Plant Science Letters.* 27: 7-20.

Zhu, Z.P.; L. Marsh, and A. Marcus (1983). De novo synthesis of 3'-nucleotidase in germinating wheat. *Plant Physiol.* 71: 295-299.