

00562

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

1
leg.



**ESTUDIO DE CARBOHIDRATOS Y ENZIMAS
RELACIONADAS DURANTE LA GERMINACION
DEL GRANO DE MAIZ**

EJEMPLAR UNICO

**T E S I S
DE MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)**

ELISEO SOSA MONTES

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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).

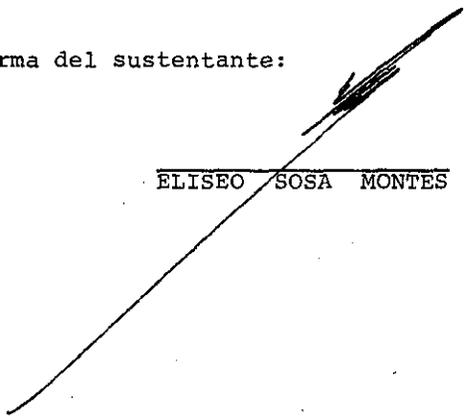
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE BIOQUIMICA,
RAMA DE BOTANICA,
COLEGIO DE POSTGRADUADOS,
CHAPINGO, MEXICO.

LABORATORIO DE NUTRICION,
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA,
ESCUELA NACIONAL DE AGRICULTURA,
CHAPINGO, MEXICO.

Nombre completo y firma del sustentante:


ELISEO SOSA MONTES

Nombres completos de los asesores del tema:

DR. ALEJANDRO BLANCO LABRA

DRA. MA. LUISA ORTEGA D.

J U R A D O

| | |
|------------|---------------------------------|
| Presidente | DR. ALEJANDRO BLANCO LABRA |
| 1er. Vocal | DRA. MARIA LUISA ORTEGA DELGADO |
| Secretario | DR. ANTONIO PEÑA DIAZ |
| Suplente | DRA. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ |
| Suplente | DR. SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL |

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Doctora Ma. Luisa Ortega D. y al Doctor Alejandro Blanco L., por su colaboración para el desarrollo y la redacción del presente trabajo.

Al Consejo Departamental de Zootecnia (E.N.A.) - y al Ing. Arturo Pró Martínez, que me concedieron las facilidades requeridas para tomar los cursos en la UNAM y desarrollar la tesis en el Colegio - de Postgraduados (C.P.).

A Luz María y a Cheito, porque representaron para mí un estímulo para la conclusión de este trabajo.

CONTENIDO

I.- INTRODUCCION

- a).- Generalidades.
- b).- Cambios de presión osmótica.
- c).- Síntesis y degradación de sacarosa.
- d).- Síntesis y degradación de almidón.
- e).- Producción de glucosa.
- f).- Producción de fitoglucógeno.

II.- OBJETIVOS

III.- MATERIALES Y METODOS

- a).- Materiales.
- b).- Germinación.
- c).- Carbohidratos solubles.
- d).- Almidón.
- e).- Amilosa.
- f).- Enzimas.

IV.- RESULTADOS

- a).- Carbohidratos solubles totales en el grano.
- b).- Identificación de los carbohidratos solubles.
- c).- Cuantificación de los carbohidratos solubles.
- d).- Carbohidratos solubles en otros tipos de maíz.

- e).- Componentes no identificados.
- f).- Carbohidratos solubles totales en embrión y endospermo de maíz H28.
- g).- Cuantificación de azúcares individuales en maíz H28.
- h).- Contenido de sacarosa en diversos tejidos embrionarios.
- i).- Actividad de invertasa.
- j).- Determinación de almidón, amilosa y amilopectina.
- k).- Actividad de amilasas.

V.- DISCUSION

- a).- Niveles de carbohidratos solubles.
- b).- Síntesis y degradación de la sacarosa.
- c).- Transporte de carbohidratos solubles.
- d).- Síntesis y degradación de almidón. Localización embrionaria de amilasas.
- e).- Producción rápida de carbohidratos solubles en el embrión.
- f).- Posible hidrólisis enzimática de la maltosa.

VI.- CONCLUSIONES

VII.- PERSPECTIVAS

VIII.- BIBLIOGRAFIA

I.- INTRODUCCION

a) Generalidades.

La germinación de las semillas es un proceso que consiste en un incremento de la actividad metabólica general y permite el crecimiento de la planta a partir del embrión (Mayer, 1975). Durante la germinación del grano de maíz aumenta el contenido de azúcares solubles en agua (Ingle et al., 1974), al mismo tiempo el contenido de almidón disminuye y aumenta la actividad de las amilasas (Goldstein y Jennings, 1975). Se sabe además que existe una relación metabólica muy estrecha entre el embrión y el endospermo y se ha postulado que durante la germinación hay liberación de ácido giberélico en el embrión que al llegar al endospermo induce la síntesis de amilasas (Paleg, 1960, Radley, 1967, Jeffers y Rubenthaler, 1974).

La degradación de almidón libera maltosa, glucosa, oligosacáridos y dextrinas que luego deben contribuir directa o indirectamente a los procesos embrionarios que se desarrollan durante la germinación y que traen como consecuencia el crecimiento de la plúmula y la radícula con un considerable aumento del peso del embrión.

b) Cambios de presión osmótica.

Es de interés el estudio de los carbohidratos so-lubles durante la germinación del grano de maíz ya que el aumento en la concentración de estos componentes debe producir un incremento en la presión osmótica del grano y se supone que este factor ejerce una acción reguladora sobre la síntesis de amilasa en la capa de aleurona de cebada, - (Jones y Armstrong, 1971), sin embargo hay discrepancia - respecto a la existencia de dicho mecanismo, (Gepstain, e Ilan, 1974). Estudios realizados con maíz muestran un incremento continuo en la producción de aminoácidos y nucleó-tidos solubles que pueden ejercer también el aumento obser-vado en la presión osmótica, (Ingle et al., 1974).

c) Síntesis y degradación de sacarosa.

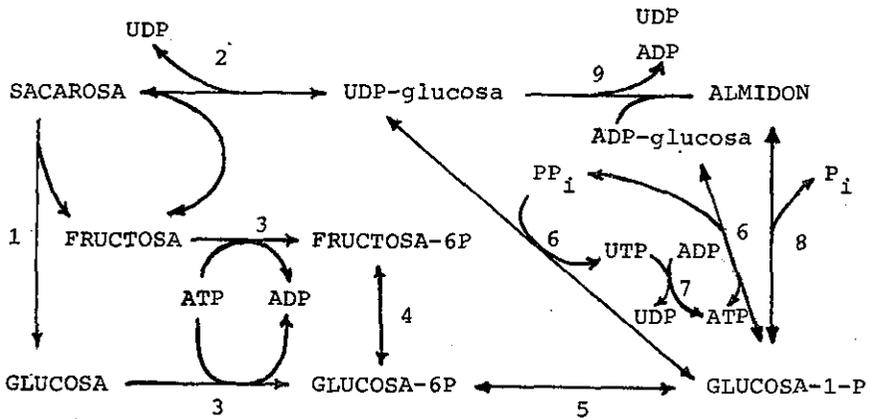
La sacarosa es un importante carbohidrato solu-ble y es considerada como el principal material de trans-porte en plantas superiores (Zimmerman, 1960). En semi-llas de cereales el incremento inicial de la sacarosa ocu-rrere en el escutelo (Edelman et al., 1959). Aparentemente la hidrólisis de la sacarosa puede ser un prerrequisito pa-ra el movimiento de azúcares hacia el endospermo durante - la formación del grano (Sakri y Shannon, 1975). Uno de -

los mecanismos para la degradación de la sacarosa es por medio de la invertasa, enzima que ha sido demostrada en varias semillas germinadas (Eldan y Mayer, 1974).

Por otra parte, se conoce también el mecanismo por medio del cual se sintetiza la sacarosa. La enzima necesaria para convertir la glucosa en sacarosa vía UTP y UDP-glucosa se encuentra en el escutelo (Edelman et al., 1959 y Nomura y Akazawa, 1974). Estudios realizados con trigo condujeron al descubrimiento de una enzima capaz de sintetizar sacarosa en el embrión (Leloir y Cardini, 1953). Ahora se sabe que existen varios caminos para la formación de sacarosa; una vía de formación de sacarosa es por medio de la enzima sacarosa sintetasa (UDP-glucosa + fructosa \rightarrow sacarosa + UDP), otro camino es por medio de sacarosa fosfato sintetasa y una hidrolasa (UDP-glucosa + fructosa-6P \rightarrow UDP + sacarosa-P \rightarrow sacarosa + P). La enzima que forma UDP-glucosa se denomina UDP-glucosa pirofosforilasa (UTP + glucosa-1P \rightarrow UDP-glucosa + PP₁) (Turner y Turner, 1975).

Algunos autores piensan que la función de la sacarosa sintetasa es la degradación de sacarosa para formar UDP-glucosa (Delmer, 1972) y que la producción de ADP-glu-

cosa in vivo por una reacción de ADP con sacarosa es improbable. Sin embargo, se sabe que la síntesis de almidón - procede a partir de ADP-glucosa, la cual se sintetiza por la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa a partir de glucosa-1P proveniente de la reacción reversible de UDP-glucosa - pirofosforilasa (Preiss y Kosuse, 1970). El proceso de - formación de almidón a partir de sacarosa ha sido ya demostrado suministrando sacarosa ^{14}C y observando la incorporación de radioactividad en amilosa y amilopectina (Porter, 1962). Con el fin de aclarar dicho mecanismo, se propuso el esquema siguiente para la transformación de sacarosa en almidón:



Conversión de sacarosa en almidón.- 1.- Invertasa
 2.- Sacarosa-UDP (ADP) glucosiltransferasa (sacarosa sintetasa)
 3.-Hexoquinasa 4.-Glucosa-P isomerasa 5.-Fosfoglucomutasa
 6.-UDP (ADP)-glucosa pirofosforilasa 7.-Nucleósido difosfoquinasa
 8.-Fosforilasa 9.-ADP (UDP)-glucosa almidón sintetasa. (Pérez et al., 1975, Turner y Turner, 1975, De Fekete y Cardini, 1964).

d) Síntesis y degradación de almidón.

La síntesis de almidón procede a partir de ADP-glucosa, UDP-glucosa ó almidón fosforilasa (Tsai y Nelson, 1968), también se sabe que su degradación es principalmente por acción de las amilasas. La formación enzimática de alfa amilasa ocurre por síntesis de novo en la capa de aleurona de cereales (Filner y Varner, 1967). También se ha observado que el tratamiento con proteasas libera amilasas (Jacobsen y Varner, 1967).

La enzima alfa amilasa se encuentra en forma de isozimas (Olered, 1975) y se piensa que estas diferentes formas enzimáticas se encuentran funcionando cooperativamente en la degradación completa del almidón (Tanaka et al., 1970), sin embargo, algunos investigadores sostienen que existen regiones altamente ramificadas (macrodextri--nas) que son resistentes a la degradación por alfa amilasa (Brammer et al., 1972).

Además de las diferencias respecto a la degradación del almidón parece ser que la enzima alfa amilasa es tá unida a los gránulos de almidón mientras que la enzima beta amilasa se encuentra libre y únicamente actúa sobre

dextrinas producidas por acción de alfa amilasa (Graham, 1974).

e) Producción de glucosa.

Además de la sacarosa, también la glucosa es un carbohidrato soluble muy importante durante la germinación. La reducción de la capacidad para germinar está precedida por una disminución de la utilización de glucosa (Abdul-Baki, 1969). La producción de glucosa es un evento vital en las primeras etapas de la germinación (Mayer, 1974).

f) Producción de fitoglucógeno.

El polisacárido fitoglucógeno se acumula en el maíz dulce, aunque también se ha encontrado en otros genotipos; ha sido demostrado que este polisacárido se encuentra en la fracción de polisacáridos solubles en agua y se asemeja bastante al glucógeno según su comportamiento de sedimentación, longitud de cadena y degradación por enzimas, se ha demostrado también que la molécula donadora de grupo glucosilo para la formación de fitoglucógeno es ADP-glucosa (Creech, 1968).

II.- OBJETIVOS

El estudio del metabolismo de carbohidratos en el grano de maíz es importante, ya que si se conocen los eventos bioquímicos de una semilla; se puede mejorar su calidad. Por ejemplo, sabiendo que durante la germinación del grano de maíz aumenta el contenido de lisina y triptofano (Dalby y Tsai, 1975), se puede recomendar su uso como semilla germinada para la nutrición. Sabiendo también que el contenido de aminoácidos y carbohidratos solubles aumentan durante la germinación (Ingle et al., 1974), se podría esperar una mejor digestibilidad del grano germinado en comparación con la semilla sin germinar, esta posibilidad sin embargo se puede ver afectada debido al incremento en la formación de paredes celulares uno de cuyos principales componentes es la celulosa que no es utilizable por los animales monogástricos. La germinación de la semilla de maíz ha sido estudiada por muchos investigadores, sin embargo, restan algunas interrogantes en el proceso. Se discuten aún los mecanismos de acción del ácido giberélico, los sitios de síntesis de los azúcares solubles y su transporte a las diferentes partes del embrión, así como los mecanismos enzimáticos involucrados.

Tampoco se conoce la relación entre las velocidades de síntesis y degradación de los carbohidratos y se han puesto de manifiesto diferencias metabólicas entre las razas de maíz, (Creech, 1968).

Por lo anteriormente expuesto y siendo el maíz un cultivo fundamental para nuestro país, se propuso este trabajo de investigación con los siguientes objetivos:

- 1) Conocer cuáles son los tejidos del grano de maíz en donde se ponen de manifiesto los incrementos en carbohidratos solubles.
- 2) Investigar la concentración e identidad de los carbohidratos solubles que se producen durante la germinación.
- 3) Estudiar la concentración y degradación del almidón y sus componentes en el grano, buscando una relación con la producción de los carbohidratos solubles.
- 4) Investigar algunas enzimas relacionadas con la degradación de los carbohidratos durante la germinación.
- 5) Buscar similitudes y diferencias bioquímicas entre diversos tipos de maíz.

III.- MATERIALES Y METODOS

a) Materiales.

Se estudiaron el maíz híbrido H28 y las razas - Dulce de Jalisco y Cristalino de Chihuahua de las colecciones del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) a quienes se agradece su colaboración.

El híbrido H28 es un maíz de color blanco con endospermo de tipo cristalino y se desarrolla a una altitud de 2000 a 2600 metros sobre el nivel del mar, siendo recomendado por su resistencia a la sequía y su capacidad reproductiva bajo condiciones de temporal. Su ciclo es de 120-135 días en Texcoco y sus alrededores y tiene la siguiente genealogía: (Mich. 21-26X (Méx. 39 comp. 1 X mich. 21-20-29 2) (Mich. 21-comp. 1-27-2 X Mich. 21-comp. 1-7-1) (Aguado et al., 1963).

El maíz Dulce de Jalisco es de color amarillo y presenta una testa invaginada que le proporciona una característica especial para poder distinguirlo fácilmente de otras razas. Su nombre deriva del carácter dulce de los

granos. Se ha encontrado principalmente en el estado de Jalisco entre 1000 y 1500 metros de altitud aunque ciertas modificaciones de esta raza se encuentran en Sonora - y Nayarit a 100 metros sobre el nivel del mar. (Wellhausen et al., 1951).

El maíz Cristalino de Chihuahua es de color blanco y posee un endospermo cristalino, se desarrolla en varios estados de la República, el maíz Cristalino de Apatzingan es de tipo dentado y se desarrolla a 2300 metros de altitud (Nat. Acad. Sci., 1954).

b) Germinación.

Las semillas con pesos similares se esterilizaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% durante 15 minutos y se germinaron en la oscuridad a una temperatura de 30°C (Goldstein y Jennings, 1975).

c) Carbohidratos solubles.

La extracción de los carbohidratos solubles se hizo con una solución de cloroformo-agua-metanol (4:3:13) (Shannon, 1968). Los tejidos de un grano se homogenizaron

en un mortero de vidrio con 10 ml de la solución de extracción, agitándose vigorosamente en un tubo de centrífuga durante 5 minutos, centrifugándose después 20 minutos a 1500 r.p.m. en una centrífuga clínica. Del sobrenadante se midieron alícuotas de 0.1 ml para hacer las determinaciones de carbohidratos totales y para desarrollar la cromatografía de intercambio iónico.

Los componentes solubles totales se determinaron por el método de fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956). La cuantificación individual de los carbohidratos se realizó en un analizador automático Technicon (Kesler, 1967), en el cual la separación se efectúa en una columna comercial de intercambio iónico tipo S marca Cromo-Beads a 54°C con un gradiente de ácido bórico-NaCl (tabla 4 y esquema 1), y los carbohidratos eluidos se hacen reaccionar con una solución de orcinol al 0.1% en ácido sulfúrico al 70% leyéndose posteriormente el color desarrollado a 420 nm. Las áreas obtenidas en el registrador y los tiempos de retención se comparan con tipos conocidos. Algunos resultados se obtuvieron haciendo la separación de los carbohidratos por cromatografía descendente en papel Whatman número 1 usando una solución de isopropanol-agua (4:1) como eluyen-

te. El reconocimiento de las sustancias problema se hace comparando con tipos conocidos y aspersion con reactivos diferenciales.

d) Almidón.

A fin de buscar un método para la determinación de almidón que conjugara la prueba rápida de fenol-sulfúrico y que pudiera efectuarse sobre muestras pequeñas, se desarrolló una metodología para la extracción del almidón y su posterior hidrólisis para la determinación de glucosa por el método de fenol-sulfúrico. El método consiste en extraer el almidón total empleando ácido perclórico al 30% (Gaines, 1973), posteriormente se hace una hidrólisis con ácido clorhídrico y la determinación de glucosa utilizando reactivo de fenol-sulfúrico.

Con el empleo del método de fenol-sulfúrico se ahorran muchos pasos de precipitación y centrifugaciones requeridas para el aislamiento del almidón; basta una extracción con cloroformo-agua-metanol para quitar los carbóhidratos solubles en agua y una segunda extracción sobre la misma muestra usando ácido perclórico al 30% de donde finalmente se toma una alícuota que se trata con 6 ml de -

ácido clorhídrico concentrado diluido 1:1 para hidrolizar el almidón.

Para ver si otros polímeros como celulosa se extraen con ácido perclórico se tomó celulosa pura y se sometió al mismo tratamiento, observándose que del total de la celulosa únicamente pasa el 1.24% a la solución perclórica. Es importante mencionar que para la extracción con ácido perclórico algunos autores recomiendan llevar a cabo previamente, la gelatinización del almidón. Para ver si era posible excluir este paso en donde por el calentamiento de la muestra se puede llevar a cabo la hidrólisis parcial de otros polímeros diferentes del almidón, se realizó la cromatografía en papel de una muestra homogenizada con agua - y se observó que al eluir con ácido perclórico al 30%, el almidón corría muy cerca del frente del solvente. Este experimento nos demostró que no se requiere gelatinización - si no que el almidón puede pasar fácilmente a la solución perclórica, después de la homogenización.

e) Amilosa.

La determinación de amilosa se realizó por medición de la coloración azul que se produce con el reactivo

de yodo (Williams et al., 1970), pero ya que se tiene el extracto perclórico del almidón, se hace la prueba directa - sobre una alícuota de dicha solución, el método es rápido, así que no dá lugar a la hidrólisis parcial del almidón, - la prueba de la amilosa debe hacerse antes de la medición del contenido de almidón. Después de hacer modificaciones por volumen, el método se puede describir en los términos siguientes: tomar 25 a 30 mg de muestra, homogenizar con - ácido perclórico al 30% hasta completar el volumen deseado (10 ml), tomar una alícuota de 0.1 ml y colocarla en un tubo de ensayo que contiene 5 ml de HCl 0.1 N y 0.1 ml del - reactivo de yodo; leer el color desarrollado a 625 nm.

Los resultados obtenidos al medir la cantidad de almidón en una muestra de maíz H28 fueron de $57.32 \pm 0.82\%$, el porcentaje de amilosa para la misma muestra fué de - $24.88 \pm 1.12\%$ y el contenido de amilopectina obtenido por diferencia fué de 32.44%. Los resultados anteriores están dados como por ciento en base húmeda.

f) Enzimas.

La actividad de invertasa se detectó por incubación de un extracto embrionario crudo en buffer de aceta--

tos 0.1 M pH 4.6 según el método empleado para medir sacarosa después de su inversión a hexosa (Bergmeyer y Klotzsch, 1963). El método se modificó viendo la hidrólisis de sacarosa por la disminución de intensidad de la mancha obtenida para dicho carbohidrato y la aparición simultánea de fructosa después de desarrollar la cromatografía en papel y revelar con un reactivo de orcinol-HCl (1:100).

Las amilasas fueron extraídas con buffer de succinato 40 mM pH 5.0 y su actividad se determinó por medición de la disminución del color azul que el almidón produce en presencia de yodo a 625 nm (Bernfeld, 1955, Blanco E. 1978). Es un criterio generalmente aceptado que por acción de calor (70°C, 15 min) se inactiva la enzima beta amilasa mientras que la enzima alfa amilasa es estable bajo las mismas condiciones (Goldstein y Jennings, 1974). Investigaciones recientes muestran que ciertas formas moleculares de alfa amilasa son sensibles al calor (Labanssat, 1975). Sin embargo, en este trabajo se hicieron experimentos para determinar amilasas antes y después del tratamiento con calor.

IV.- RESULTADOS

a) Carbohidratos solubles totales en el grano.

Con el objeto de obtener una curva estandar para medir la concentración de carbohidratos solubles, se tomaron diferentes cantidades de glucosa, las cuales se hicieron reaccionar con el reactivo de fenol-sulfúrico obteniéndose los resultados mostrados en la figura 1; estos valores nos sirvieron para obtener la ecuación de regresión mostrada; así que los resultados obtenidos en las muestras estarán dados como microgramos equivalentes de glucosa.

La figura 2, nos muestra los resultados obtenidos al medir la producción de componentes extraíbles con cloroformo-agua-metanol y polisacáridos solubles en agua, durante la germinación del grano de maíz H28. Se puede observar que los niveles de carbohidratos solubles disminuyen inicialmente, experimentando un importante incremento después del sexto día de germinación. Empleando el método de Shannon, no se encontraron cambios detectables en el contenido de polisacáridos solubles en agua, así que se decidió hacer las observaciones posteriores sobre el extracto obtenido con cloroformo-agua-metanol que contiene los -

carbohidratos solubles en agua.

Para saber cuáles son los tejidos del grano de maíz que contribuyen principalmente al incremento en la producción de carbohidratos solubles, se estudió el endospermo en comparación con los tejidos embrionarios a los 3 días de germinación. La tabla 1, nos muestra el contenido de carbohidratos solubles en los diferentes tejidos del grano de maíz H28, obteniéndose valores máximos en los tejidos embrionarios, mientras que los valores más bajos se observan en endospermo y cutícula.

b) Identificación de los carbohidratos solubles.

Con el objeto de conocer la naturaleza química de los carbohidratos presentes en el embrión y el endospermo de maíces no germinados, en comparación con maíces de 6 días de germinación se realizó la cromatografía en papel que se muestra en la figura 3 encontrándose una alta concentración de sacarosa en el embrión de maíces no germinados y de seis días de germinación, así mismo se observa una mancha de glucosa en el embrión y el endospermo al sexto día del proceso, mientras que en el endospermo sin germinar no se detecta sacarosa.

Estos resultados se corroboraron utilizando una columna de intercambio iónico, empleando para ello un analizador automático de carbohidratos de la marca Technicon, según el procedimiento que se describe en materiales y métodos. Las figuras 4 y 5 nos muestran los resultados obtenidos; se observan picos de glucosa y sacarosa en el embrión, pero no fué posible detectar sacarosa en el endospermo; es interesante observar que no se detecta maltosa en el endospermo aún tratándose de maíces germinados; era de esperarse encontrar niveles elevados de maltosa ya que se sabe que las amilasas comienzan a actuar desde los primeros días de germinación (Blanco, E., 1978). Con el objeto de observar la producción de maltosa, se utilizaron granos de maíz de 3 días de germinación poniendo en la columna de cromatografía una cantidad mucho mayor de muestra y obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 6 observándose picos de maltosa y sacarosa en el endospermo, sin embargo, existe una diferencia notable con el contenido de sacarosa en el embrión. Con el objeto de hacer esta comparación se desarrolló el cromatograma mostrado en la figura 7 a partir del cual se puede concluir que el contenido de sacarosa en el embrión es 10 tantos mayor que en el endospermo, comparándolos en base seca.

Al hacer la cromatografía de intercambio iónico, se observan picos de rápida movilidad que bandean junto a la sacarosa según se puede ver en algunos de los cromatogramas presentados; se hicieron pruebas para ver la naturaleza de estos picos encontrándose que el metanol del solvente bandea en dicha posición, posteriormente se encontró que también el alcohol etílico sale con el mismo tiempo de retención.

c) Cuantificación de los carbohidratos solubles.

La siguiente fase del trabajo consistió en medir cuantitativamente el contenido de sacarosa y demás azúcares solubles que se producen durante la germinación. Se hicieron pruebas para ver si el área resultante bajo la curva obtenida en el registrador del equipo automático de cromatografía, era proporcional al contenido de carbohidrato puesto en la columna. La figura número 8, nos muestra uno de los resultados obtenidos al medir las áreas del pico de sacarosa.

Previamente al desarrollo del cromatograma de la figura 8, se hicieron pruebas para observar si la salida del pico de sacarosa se afectaba por la variación en la

concentración de los otros carbohidratos solubles en la muestra, se observó que los tiempos de retención de sacarosa no se afectaban por la variación en la concentración de glucosa y fructosa, por lo tanto, se pueden poner muestras sucesivas para detectar únicamente los picos de sacarosa, los otros carbohidratos solubles se retienen en la columna.

Con objeto de conocer la cantidad de muestra por centímetro cuadrado del área bajo la curva graficada en el registrador, se hicieron varias pruebas obteniéndose los resultados que se presentan en la tabla 2. Se observa que se necesitan valores elevados de maltosa y fructosa para obtener un centímetro cuadrado de área, este resultado se debe probablemente a diferencias en los coeficientes de extinción de los productos de reacción obtenidos con el reactivo de orcinol 6 al rearrreglo molecular de carbohidratos debido a las condiciones alcalinas del buffer de elución, (Walborg y Lantz, 1968).

d) Carbohidratos solubles en otros tipos de maíz.

Con el fin de comparar algunas variedades en el contenido de carbohidratos solubles durante la germinación se hicieron los experimentos mostrados en las figuras 9 y

10, utilizando las razas Dulce de Jalisco y Cristalino de Chihuahua. En ambos casos se observa el patrón ya encontrado en maíz H28, respecto al contenido total de carbohidratos solubles en agua; hay una disminución inicial seguida de un importante incremento a partir del segundo día de germinación. El contenido de sacarosa aumenta ligeramente en el embrión de maíz Cristalino de Chihuahua pero disminuye en el embrión de maíz Dulce de Jalisco. Los niveles de glucosa y fructosa aumentan en ambas razas siendo la sacarosa el carbohidrato soluble más abundante.

La figura 11, nos muestra la cromatografía de intercambio iónico de una muestra de maíz Dulce de Jalisco; se observa en la región del pico de la glucosa la superposición de un carbohidrato que por su posición podría ser xilosa, se hizo la cromatografía del extracto en papel y no se comprobó la presencia de xilosa, por otra parte, se observó que cuando la concentración de carbohidrato es elevada, los picos tienden a desplazarse hacia el inicio del cromatograma, es decir que se adelanta la salida de los componentes de las muestras, así que muy probablemente se adelantó el pico de glucosa hasta la posición de salida de xilosa en esta muestra, el área total mostrada en la figu-

ra se tomó para calcular el porcentaje de glucosa.

e) Componentes no identificados.

Es interesante hacer notar que en todos los cromatogramas desarrollados, tanto con muestras del embrión - como del endospermo, se observan picos de baja movilidad - que salen después de la glucosa; no se hicieron pruebas para la identificación de estos componentes; sin embargo, se observó que la glucosa pura, no importa la marca (Merck, - Baker ó Monterrey), produce picos en la misma posición. Estas observaciones nos hicieron pensar que la glucosa se oxida en su paso por la columna de cromatografía y se forma probablemente algún producto de descomposición que se - retiene fuertemente por ser más polar que la glucosa.

Se pensó que los correspondientes picos de las - muestras son probablemente producidos por la glucosa presente en esos tejidos, sin embargo, también se observó que las muestras de embrión de cero días de germinación que no contienen glucosa, producen el mismo pico característico. Estas ideas no se demostraron por no ser el objetivo de es te trabajo, pero podemos afirmar que el tratamiento con - cloroformo-agua-metanol de las muestras del embrión, ex--- trae componentes de baja movilidad. Se pensó que esos pi-

cos fueran producidos por glicerina obtenida por hidrólisis de triglicéridos, pero se vió que este alcohol sale antes de la maltosa excluyéndose dicha posibilidad. Las observaciones mencionadas en el párrafo anterior, se muestran en la figura 12.

f) Carbohidratos solubles totales en embrión y endospermo de maíz H28.

Con el objeto de buscar la relación entre la producción de carbohidratos solubles en el embrión y el endospermo durante la germinación, se realizaron las determinaciones descritas previamente con el híbrido H28. La figura 13, nos muestra los resultados obtenidos. Se observa una disminución inicial en el embrión seguida de un incremento después del segundo día de germinación, y por observación de las barras que indican desviación estandar, se puede pensar que las diferencias encontradas son significativas, en el endospermo se detecta un continuo incremento desde el inicio de la germinación. En cualquier momento, el contenido de carbohidratos solubles es menor en el endospermo que en el embrión, calculándolos como por ciento en base seca.

g) Cuantificación de azúcares individuales en maíz H28.

Con el objeto de medir la producción de los principales carbohidratos solubles del embrión en maíz H28, se realizó el experimento mostrado en la figura 14; se puede observar un patrón similar al obtenido con maíz Cristalino de Chihuahua; hay una disminución inicial en el porcentaje de sacarosa seguida de un incremento a partir del segundo día de germinación. También se observan incrementos continuos de glucosa y fructosa desde el inicio de la germinación. Contrariamente a lo que acontece en el grano de arroz, (Palmiano y Juliano, 1972), el carbohidrato soluble más importante es la sacarosa. La disminución inicial en el porcentaje de sacarosa que se muestra en la figura 14, podría ser consecuencia del incremento en el peso del embrión, así que se decidió observar si el contenido total de sacarosa experimentaba una disminución. En la figura 15, se muestran los resultados de la figura 14, expresándolos como miligramos de carbohidrato por embrión.

Posteriormente se hicieron determinaciones de los niveles de carbohidratos solubles en el endospermo. Se había ya detectado la presencia de maltosa y sacarosa. La figura 16, nos muestra las concentraciones obtenidas, se -

puede ver una disminución inicial en el contenido de sacarosa seguida por un incremento continuo a partir del segundo día de germinación; los niveles de glucosa, aumentan desde el inicio de la germinación mientras que los niveles de fructosa y maltosa aumentan a partir del segundo día del proceso. La importancia de estos cambios, en especial la producción de maltosa se discutirá más adelante.

h) Contenido de sacarosa en diversos tejidos embrionarios.

Para conocer el contenido de sacarosa en los diversos tejidos del embrión del maíz H28, se determinó este carbohidrato por cromatografía de intercambio iónico. Los resultados pueden verse en la tabla 3, observándose los valores más bajos en la plúmula.

i) Actividad de invertasa.

Por observación de los resultados de la tabla 3, donde se pueden ver bajas concentraciones de sacarosa en la plúmula y pensando que las enzimas implicadas en la producción de hexosas fueran responsables de hidrolizar la sacarosa para producir glucosa y fructosa, se hicieron experimentos para detectar actividad de invertasa al inicio de la germinación. Utilizando el método de Bergmeyer no se -

detectó hidrólisis de sacarosa en la plúmula aún incubando el extracto a 50°C, sin embargo, en el centro del embrión se obtuvo el resultado mostrado en la figura 17. Se observó una disminución en la intensidad de la mancha de sacarosa a medida que aumenta el tiempo de incubación. Según se mencionó en materiales y métodos, el revelador usado fué una solución de orcinol-HCl. Se observó que paralelamente a la desaparición de la intensidad de la mancha de sacarosa, comienza a aparecer una mancha de fructosa a medida que aumenta el tiempo de incubación. Se hicieron las mismas pruebas utilizando sacarosa pura, se observa que la intensidad de la mancha de sacarosa es constante; sóloamente hasta los 90 minutos de incubación aparece una mancha de fructosa; este último experimento se realizó para excluir la posibilidad de que la fructosa que aparece en el cromatograma de la muestra sea el resultado de una hidrólisis no enzimática de la sacarosa debido a la temperatura de 50°C y las condiciones ácidas de la solución reguladora de acetatos.

j) Determinación de almidón, amilosa y amilopectina.

Se hicieron pruebas para medir los componentes del almidón en el embrión y en el endospermo durante la

germinación del maíz H28. La figura 18 nos muestra los resultados obtenidos, se puede ver que los niveles de estos polisacáridos en el embrión, no cambian notoriamente a pesar de que parece haber una disminución en el contenido de amilosa en el segundo día de la germinación; sin embargo, el contenido de almidón no se modifica. En el endospermo el contenido de amilosa permanece constante. Hay sin embargo un ligero aumento en el contenido de almidón hasta el cuarto día y después se presenta una disminución. Estos cambios no se deben al error experimental ó a la variabilidad genética según se puede ver por observación de las barras que indican desviación estandar.

A fin de observar los resultados expresados como miligramos de carbohidratos por endospermo y por embrión, se presenta la figura 19, en donde se puede ver una continua degradación del almidón en el endospermo habiendo una disminución simultánea del contenido de amilosa y amilopeptina. En el embrión por el contrario, se observa una disminución inicial seguida de un continuo incremento después del segundo día de germinación, es importante hacer notar que los niveles de amilosa en el embrión, permanecen constantes hasta el sexto día de germinación. En el endosper-

mo se observa por el contrario una disminución gradual en el contenido de este polisacárido, lo cual era de esperarse, puesto que ha sido demostrada la actividad de alfa-amilasa en este tejido durante la germinación; pero ¿por qué los niveles de amilosa son constantes en el embrión? ¿no existe actividad de amilasa y por lo tanto, éste polisacárido no se degrada? ¿Hay degradación y formación simultánea, de tal manera que su velocidad de formación es igual a su velocidad de degradación y así los niveles permanecen constantes durante la germinación? A fin de responder estas preguntas se llevaron a cabo mediciones de actividad de amilasas, teniendo como antecedente el reporte de que la actividad amilolítica total se incrementa en grano entero a partir del primer día de germinación (Blanco, E., 1978).

k) Actividad de amilasas.

Con objeto de conocer si existe actividad de amilasas en el embrión, se realizó el experimento mostrado en la figura 20, en donde se puede ver que la actividad de amilasas del embrión es tan importante como en el endospermo durante los primeros días de germinación, a pesar de las diferencias en tamaño, pero después del cuarto día dis

minuye la actividad en el embrión mientras que en el endospermo continúa incrementándose. La misma figura, nos muestra una actividad de amilasas similar en el embrión y el endospermo a los dos días de germinación.

Para conocer cual es la actividad de amilasas en el primer día de germinación en ambos tejidos, y con el fin de diferenciar por el proceso de sensibilidad a la temperatura, se desarrollaron los experimentos mostrados en las figuras 21 y 22. Previamente se había detectado que los extractos de endospermo obtenidos con buffer de succinato 40 mM de pH 5.0 contienen almidón, mientras que los extractos obtenidos del embrión no producen coloración azul con yodo, estas observaciones nos hicieron pensar que la actividad de amilasas es mayor en el embrión que en el endospermo en el primer día de germinación o que la presencia de almidón en los extractos endospermicos se debe a su elevada concentración en este tejido. La figura 21, nos muestra los resultados obtenidos en el endospermo. Se observa que no existe actividad de amilasas en el primer día de germinación. La actividad de amilasas estables al calor se incrementa continuamente desde el primero al quinto día de germinación y después experimenta una disminución -

importante. Las amilasas sensibles al calor presentan variaciones durante la germinación observándose valores mínimos entre el cuarto y quinto día del proceso y después aumentan su actividad.

La figura 22, nos muestra los resultados obtenidos en embrión. Las actividades de amilasas estables y sensibles al calor tienden a aumentar desde el inicio de la germinación. Es importante observar que la actividad total de amilasas es más alta en el embrión a los dos días de germinación pero a partir del segundo día del proceso predomina la actividad de amilasas en el endospermo. En ambos tejidos es mayor la actividad de amilasas estables al calor.

V.- DISCUSION

a) Niveles de carbohidratos solubles.

Las observaciones de la figura 2 y la tabla 1, - en donde se puede ver un importante incremento en el contenido de carbohidratos solubles en agua, encontrándose las concentraciones más elevadas en los tejidos embrionarios, nos permiten pensar en la existencia de una gran actividad metabólica que se traduce en el crecimiento de una nueva - planta. Además podemos pensar en un efecto importante de presión osmótica en el grano de maíz durante la germinación, puede decirse que es el embrión en donde aparece principalmente este incremento de presión, la cual es generada por la producción de componentes solubles en agua siendo glucosa y sacarosa los principales carbohidratos implicados en el proceso. Las concentraciones de carbohidratos solubles en agua del endospermo y cutícula son bastante bajos; pues to que estos tejidos del grano no están destinados a cre-cer, si no que al contrario, su peso disminuye considera-blemente durante los primeros seis días de germinación, se puede sugerir que la elevada producción de carbohidratos - solubles que aparecen durante la germinación es propia de los tejidos en crecimiento.

Es interesante observar en la figura 3 la presencia de glucosa y sacarosa en embrión de maíz H28 de seis días de germinación, pero también es importante mencionar que no se detecta maltosa. Se esperaba encontrar este último disacárido en el embrión debido a la actividad de las amilasas sensibles al calor. Estas enzimas se identificaban como beta amilasas cuyo producto de reacción es maltosa (Goldstein y Jennings, 1975, Mayer y Poljakoff, 1975), pero la ausencia de este disacárido en el embrión, nos permite pensar en que un importante proceso de hidrólisis de maltosa se encuentra funcionando en el grano de maíz durante la germinación; que el proceso sea endospermico ó embrionario no se dilucidó en este trabajo; sin embargo se puede mencionar a partir de los resultados obtenidos en esta investigación, que la existencia de maltosa difiere de la existencia de almidón y sacarosa en que el primer carbohidrato es endospermico mientras que los dos últimos se detectan en el embrión y en el endospermo (figuras 15 y 16).

Para dar un grado mayor de generalización a las observaciones hechas con anterioridad, se decidió estudiar la producción de carbohidratos solubles en diferentes razas de maíz, por tal motivo, se desarrollaron los experi-

mentos mostrados en las figuras 9 y 10, empleando embriones de las razas Dulce de Jalisco y Cristalino de Chihuahua; encontrándose también que el principal carbohidrato soluble del embrión es sacarosa, cuyos niveles se determinaron durante la germinación siendo del 15% aproximadamente al inicio del proceso. Se encontró también que el porcentaje de glucosa aumenta continuamente desde el inicio de la germinación y teniendo en cuenta que durante la germinación las células embrionarias se van diferenciando continuamente para dar lugar a la formación de nuevos tejidos podemos proponer con cierto grado de generalización que la aparición de glucosa en el grano de maíz puede ser un índice apropiado de diferenciación celular. Además se puede también decir que el principal carbohidrato soluble en el grano de maíz es sacarosa y su localización es embrionaria.

b) Síntesis y degradación de la sacarosa.

En el híbrido H28 se realizaron los experimentos mostrados en la figura 13 a partir de los cuales se puede concluir que tanto en el endospermo como en el embrión hay un incremento continuo en el contenido total de carbohidratos solubles en agua, pero siempre es mayor el contenido de carbohidratos solubles en el embrión durante la germinación.

ción tal como se había visto ya en la tabla 1 discutida con anterioridad. Las figuras 3, 4 y 5 revelan que existe una importante diferencia en el contenido de sacarosa entre el embrión y el endospermo de maíz H28. Puede afirmarse que el contenido de sacarosa del embrión es mucho mayor que el del endospermo, pero además de sacarosa hay producción de glucosa en ambos tejidos. Ahora bien, ¿de dónde proviene la glucosa del embrión? Sabemos que durante la germinación del grano de maíz hay un incremento continuo en los niveles de este carbohidrato, tal como se muestra en la figura 14; esta glucosa puede provenir del endospermo o producirse en el embrión a partir de la sacarosa que se encuentra en grandes cantidades según ya hemos visto con anterioridad. En la figura 14, también se muestra que los niveles de sacarosa experimentan una disminución en los primeros días de germinación, lo cual sugiere la existencia de un proceso de degradación de sacarosa. Esta sugerencia puede hacerse también por observación de la figura 15, en donde se presentan los resultados expresándolos como miligramos de carbohidrato soluble por embrión.

Por lo tanto, se hicieron pruebas para detectar actividad de invertasa al inicio de la germinación. El ex

perimento mostrado en la figura 17, nos permite confirmar la existencia de esta actividad enzimática al menos en el primer día de germinación, pero además es importante observar que después del segundo día del proceso, el contenido de sacarosa por embrión se incrementa en relación con los niveles iniciales (figuras 14 y 15); esta observación permite hacer la siguiente sugerencia: si la actividad de invertasa no cambia durante la germinación, en las etapas intermedias del proceso parece que hay un predominio de la formación de sacarosa sobre su degradación. En otras palabras, a partir del segundo día de germinación parece que existe un interesante fenómeno de producción de sacarosa en el embrión del maíz H28, este fenómeno podría continuar hasta el cuarto día de germinación a partir del cual podría ser constante y entonces sería posible proponer que la velocidad de síntesis de sacarosa es igual a su velocidad de degradación en las etapas finales de la germinación.

Como se detectó una importante actividad de invertasa en el primer día de germinación (figura 17), podemos además hacer la siguiente sugerencia, la glucosa producida en el embrión puede provenir en parte de la sacarosa que está en ese mismo tejido y la importante disminución -

en los niveles de sacarosa en las primeras etapas de germinación se podría originar parcialmente debido a la actividad de invertasa en el embrión ¿cuál es la razón por la cual se produce glucosa desde los primeros días de la germinación?, probablemente los tejidos embrionarios en formación requieren un substrato más fácilmente utilizable, la obtención del cual se puede generar rápidamente por acción de la invertasa.

Ahora bien, ¿de dónde proviene la sacarosa que se forma en el embrión?. Sabemos que los niveles de este carbohidrato en el endospermo son bastante bajos y que la síntesis de sacarosa ha sido demostrada en el embrión de varias semillas (Leloir, 1953, Edelman, 1959 y Delmer, 1972). También se sabe que la sacarosa puede provenir de los lípidos (Beevers, 1961). El aumento de sacarosa al cuarto día que se observa en la figura 14, corresponde con las observaciones de que la malato sintetasa y la isocitratasa tienen un aumento de actividad al cuarto día de germinación en el escutelo de maíz (Longo y Longo, 1970). Con base en estas ideas podríamos sugerir que el sitio principal de síntesis de sacarosa en el grano de maíz es embriionario.

c) Transporte de carbohidratos solubles.

También es posible pensar en la existencia de un importante proceso de transporte de carbohidratos solubles del endospermo al embrión; este proceso se puede iniciar - en los primeros días de germinación y si bien es cierto - que este trabajo no demostró la existencia del fenómeno, - la observación de que los niveles de carbohidrato soluble son bajos en el endospermo, aún en los granos de maíz de - seis días de germinación, parece indicar que de alguna manera los carbohidratos solubles en agua que se producen en el endospermo contribuyen al incremento en el peso del embrión. En otros términos, la elevada actividad de amilasas debe producir material que pasa del endospermo al embrión, puesto que en todos los estadios de la germinación, se observan niveles bajos de carbohidratos solubles en el endospermo, (figura 16). Además, los datos de la figura - 20 indican que la actividad de amilasas es baja en los primeros días de germinación y aumenta a partir del segundo día del proceso y por observación de los granos germinados se sabe que al segundo día de germinación existe un considerable incremento en el peso del embrión tal como se ve - en las figuras 9 y 10.

Por otra parte, el transporte de polisacáridos - del endospermo es improbable, debido al peso molecular de dichos componentes y la mayor parte del crecimiento del embrión se tiene que realizar a expensas del endospermo; - pues bien, si la producción de carbohidrato soluble es alta en este tejido, debido a la actividad de las amilasas - y los niveles de estos carbohidratos solubles son bajos según se puede ver en la figura 16 entonces lo más probable es que se movilizan rápidamente hacia el embrión para utilizarse en el crecimiento de la plántula.

d) Síntesis y degradación de almidón. Localización embrionaria de amilasas.

El siguiente aspecto que se tocó en esta investigación, fué la relación existente entre los niveles de polisacáridos y la actividad de las enzimas que los degradan. Las figuras 18 y 19 nos muestran los resultados obtenidos al medir los niveles de estos polisacáridos expresándolos como por ciento en base seca y en miligramos de carbohidrato por grano individual. En la figura 19 se observa una disminución en la cantidad total de almidón en el endospermo; no así en el embrión, en el que se presenta un fenómeno interesante de disminución inicial, seguida por un im--

portante incremento después del segundo día de germinación; como se supone que el transporte de almidón desde el endospermo hasta el embrión es improbable, debido a su alto peso molecular, se puede sugerir que sus niveles en el embrión aumentan debido a formación por síntesis de novo.

Otra observación interesante respecto a los niveles de estos polisacáridos es que el contenido total de amilosa por embrión es constante durante la germinación; se ha demostrado que la enzima alfa amilasa se produce en el escutelo y su principal sitio de acción es en el endospermo, mientras que la enzima beta amilasa se encuentra preformada en este último tejido aún en semillas latentes (Dure, 1960). Se puede establecer ahora la siguiente pregunta: ¿hay degradación de almidón en el embrión ó es este fenómeno exclusivo del endospermo?

La figura 20, nos muestra los resultados obteni--dos al medir actividades de amilasa en el embrión y en el endospermo; se observa un importante incremento en esta actividad enzimática en ambos tejidos, pero la actividad de amilasa en el embrión disminuye después del cuarto día de germinación, sin embargo el contenido de almidón aumenta a partir del segundo día del proceso (figura 19), aún cuando

existe actividad de amilasas, por lo tanto, podemos sugerir que al mismo tiempo que el almidón se está degradando en el embrión, también existe un proceso de formación de almidón simultáneo, por el cual también los niveles totales de amilosa en el embrión podrían permanecer constantes (figura 19), en otros términos, parece que las velocidades de síntesis y degradación de amilosa en el embrión son similares durante la germinación.

Una vez obtenidos los resultados que se muestran en la figura 20, se realizaron experimentos para conocer cuales son los principales tejidos del embrión que contribuyen a su elevada actividad de amilasas, para lo cual se tomaron granos de maíz de 6 días de germinación, observándose que las plúmulas no poseen esta actividad enzimática mientras que el escutelo presentó una actividad de 1.11 ± 0.135 miligramos/min/escutelo; pudiendo decirse a partir de esta información, que la actividad de amilasas radica fundamentalmente en el centro del embrión (escutelo y eje embrionario) el cual es también el tejido en donde se detectó actividad de invertasa tal como se muestra en la figura 17.

Tal como acontece con la actividad amilolítica, se localizó el almidón en el centro del embrión y no se detectaron cantidades apreciables en la plúmula; este era el resultado esperado ya que no parecería lógico que existiera actividad amilolítica en un tejido que no contiene almidón. El almidón y la sacarosa presentan un comportamiento similar porque sus niveles disminuyen en el embrión durante los primeros días de germinación, pero difieren porque el almidón se encuentra ausente de la plúmula mientras que la sacarosa se detecta en cantidades apreciables en este tejido. Suponiendo que este comportamiento se debe a que la sacarosa o sus componentes se translocan desde el centro del embrión hacia la plúmula, mientras que la amilosa no se moviliza debido a su peso molecular elevado, podemos decir que el presente trabajo muestra la posible existencia de un proceso de síntesis de novo de almidón en el embrión.

La aparición de actividad de amilasas después del primer día de germinación en el endospermo se explica sabiendo que la producción de alfa amilasa es por medio de un mecanismo de síntesis de novo (Filner y Varner, 1967). Sabemos que este fenómeno es relativamente lento porque se

necesita el desarrollo de todo el sistema requerido para la síntesis de proteínas. En el embrión, por el contrario la aparición de actividad de amilasas se inicia rápidamente; parece ser entonces que el mecanismo de liberación de amilasas en el embrión y en el endospermo es diferente y que probablemente la actividad de amilasas en el embrión no se realice por síntesis de novo, siendo probable que la imbibición permita la liberación de enzimas preformadas, lo cual llenaría el requerimiento del embrión para la producción rápida de carbohidratos solubles utilizados en las primeras etapas de su crecimiento.

e) Producción rápida de carbohidratos solubles en el embrión.

Los datos de las figuras 21 y 22 implican que la velocidad inicial de producción de carbohidratos solubles en el endospermo es menor que en el embrión, y parecería que al inicio de la germinación, este tejido hidroliza sus propios carbohidratos de reserva para que pueda crecer la nueva plántula. Al hacer la extracción de amilasas con solución reguladora de succinato 40 mM se puede demostrar una elevada concentración de almidón soluble en el endospermo, mientras que los extractos embrionarios no contie-

nen almidón. Estos datos permiten pensar que la alta concentración de almidón que se detecta en los extractos endospermicos se debe a la elevada concentración de almidón almacenado en este tejido (figuras 18 y 19), o que la actividad de amilasas del embrión es mayor que la actividad de amilasas del endospermo en los primeros días de germinación, por tal motivo, el almidón del endospermo no se degradaría rápidamente y sería posible detectar su presencia en los extractos enzimáticos, mientras que en el embrión, el almidón se podría hidrolizar rápidamente. Las figuras 21 y 22 nos muestran que en el primer día de germinación no se detectó actividad de amilasas en el endospermo, mientras que la actividad de amilasas del embrión existe en niveles apreciables, además se puede ver que en el segundo día de germinación la actividad de amilasas en el embrión es mayor que en el endospermo, este comportamiento está en contraste con la mayor actividad de amilasas en el endospermo durante las etapas finales de la germinación. Parece ser que estos experimentos sugieren la existencia de un mecanismo inicial de producción de carbohidratos solubles para que el embrión pueda crecer en las primeras etapas de germinación, este mecanismo sería embrionario y se establecería antes que el sistema amilolítico para la

degradación del almidón en el endospermo alcance su máximo desarrollo. Podemos sugerir entonces que la producción de carbohidrato soluble en el endospermo es un evento tardío durante la germinación.

f) Posible hidrólisis enzimática de la maltosa.

Una observación respecto a las gráficas 21 y 22, es que después del quinto día de germinación hay una importante disminución en la actividad de amilasas estables al calor, mientras que la actividad de las amilasas sensibles al calor se incrementa después de dicho período. La presencia de estas enzimas es congruente con la existencia de maltosa en el endospermo, en otras palabras si suponemos - que una fracción de las amilasas sensibles al calor (beta amilasa) producen maltosa, entonces la existencia de maltosa en el endospermo a partir del segundo día de germinación se explica por la presencia de amilasas sensibles al calor. Sin embargo en el embrión a pesar de que existe un incremento en la actividad de estas enzimas no se detectó maltosa, por lo tanto es posible suponer la existencia de un importante proceso de hidrólisis de maltosa en el embrión. La actividad de maltasa se ha demostrado en el endospermo (Mayer, 1975), lo cual es congruente con

los niveles bajos de maltosa en este tejido y existe así-- mismo una importante producción de glucosa (figura 16). Entonces, si bien es cierto que el presente trabajo no demostró la existencia de maltasa en el grano de maíz permite suponer sin embargo la existencia de esta actividad enzimática en el embrión.

En resumen, los resultados anteriores parecen indicar que existen eventos propiamente embrionarios íntimamente relacionados con la producción de substrato disponible para que el embrión se pueda desarrollar en los primeros días de germinación; es decir, la disminución en el contenido de almidón y sacarosa en los primeros días de germinación en el embrión, podría tener el fin de proporcionar carbohidrato soluble para que el embrión se pueda desarrollar antes que la actividad de amilasas del endospermo se desarrolle completamente, en esta forma el crecimiento del embrión se podría llevar a cabo desde los primeros días de germinación y así el proceso ya iniciado no se detendría porque si el endospermo no estuviera preparado para proporcionar substrato utilizable en los primeros días de germinación, el embrión proporcionaría los mate---

riales requeridos para su propio crecimiento.

VI.- CONCLUSIONES

- a) Durante la germinación, el grano de maíz experimenta un importante incremento en la concentración de carbohidratos solubles.
- b) La mayor concentración de carbohidratos solubles se localiza en los tejidos embrionarios y parece que es propia de las partes en crecimiento.
- c) El principal carbohidrato soluble al tercer día de germinación es la sacarosa, siendo su concentración 10 veces mayor en el embrión que en el endospermo. También se detectó fructosa en el embrión y el endospermo, pero el disacárido maltosa únicamente se encontró en el endospermo.
- d) Los niveles de glucosa en el embrión se incrementan constantemente desde el inicio de la germinación y parecen proporcionar un índice apropiado de diferenciación celular.
- e) Existe una importante actividad de invertasa en el embrión al inicio de la germinación, así que, la glucosa detectada en ese período podría provenir parcialmente de la degradación de sacarosa.
- f) Se propone la existencia de un fenómeno de síntesis y

degradación de sacarosa en el embrión. Parece que existen 3 estadios en la germinación del grano de maíz: en el primero de ellos (hasta el segundo día de germinación) parece que hay un predominio de la degradación de sacarosa; en el estadio intermedio (del segundo al cuarto día de germinación) parece que predomina la sin tesis sobre la degradación y en las etapas finales del proceso es posible que la velocidad de síntesis sea igual a la velocidad de degradación de sacarosa.

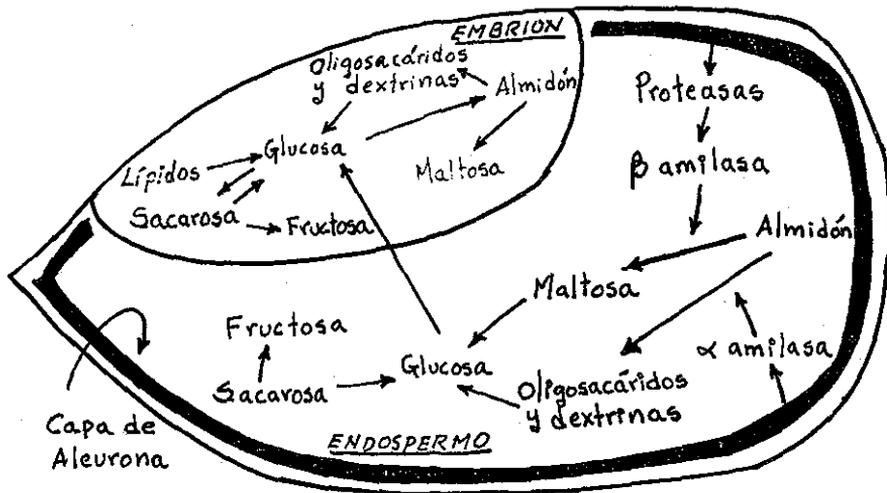
- g) De los datos experimentales se deduce que existe trans porte de carbohidratos solubles desde el endospermo al embrión.
- h) Existe una importante actividad de amilasas tanto en el embrión como en el endospermo durante la germinación
- i) Los niveles de amilosa en el embrión son constantes du rante la germinación, mientras que el almidón disminuye inicialmente y luego se incrementa a partir del segundo día del proceso. Si a pesar de la gran actividad de las amilasas, los niveles de almidón se incrementan en el embrión, se puede deducir que existe un mecanismo de síntesis de almidón en ese tejido.
- j) Un corolario de la anterior afirmación es que la velo-

cidad de síntesis de amilosa en el embrión podría ser igual a su velocidad de degradación, por lo tanto, el incremento en los niveles de almidón se podría deber a la formación de amilopectina.

- k) En determinadas etapas de la germinación, entre los tejidos embrionarios, el centro del embrión contiene la máxima concentración de almidón, la máxima actividad de amilasas y la máxima actividad de invertasa.
- l) En el embrión parece que existe un mecanismo inicial para la producción de carbohidratos solubles, los cuales pueden formarse a partir de almidón y sacarosa. Por otra parte, no se detectó maltosa en el embrión a pesar de la existencia de enzimas sensibles al calor; estas observaciones parecen indicar que la glucosa proveniente de la sacarosa y del almidón embrionarios proporciona la energía requerida para crecer en las primeras etapas de la germinación, probablemente hasta que el mecanismo endospermico para la degradación del almidón se encuentre proporcionando los carbohidratos solubles requeridos para el crecimiento del embrión.

A continuación se presentan algunas de las principales sugerencias obtenidas, a fin de intentar localizar

las esquemáticamente en los diferentes tejidos del grano de maíz.



Hipótesis de la movilización de carbohidratos que podría estar ocurriendo durante la germinación del grano de maíz. La presencia de los componentes químicos representados ha sido demostrada. Hay algunas interrogantes sin embargo, respecto a las flechas que indican formación y transporte de enzimas y carbohidratos. El presente trabajo sugiere que los eventos embrionarios de formación de glucosa aparecen primero en embrión que en el endospermo aunque la producción de carbohidratos solubles posteriormente es mayor en este último tejido.

VII.- PERSPECTIVAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El trabajo realizado proporciona muchas sugerencias en relación con fenómenos que no se conocen detalladamente en el desarrollo de la germinación, los cuales se podrían confirmar utilizando diversas metodologías. Una de las investigaciones más importantes sería la demostración del proceso de síntesis de almidón en el embrión, utilizando isótopos radioactivos; el experimento podría realizarse incubando el embrión de maíz en presencia de sacarosa- ^{14}C y observando la incorporación de radioactividad en el almidón embrionario, este planteamiento supone la utilización de sacarosa. Si la formación embrionaria de almidón requiere monosacáridos ó maltosa, el experimento se podría realizar germinando el embrión en presencia de glucosa- ^{14}C fructosa- ^{14}C ó maltosa ^{14}C .

Los resultados obtenidos en este trabajo con sacarosa y almidón respecto a su degradación embrionaria en las primeras etapas de la germinación, podrían ampliarse a otros carbohidratos; sería conveniente por ejemplo, estudiar la velocidad de hidrólisis de maltosa en el embrión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tal como acontece con la actividad de las amilasas, se esperaría encontrar una importante actividad de maltasa en los primeros días de la germinación. Si se encuentran resultados similares, se confirmarían las ideas expresadas previamente en relación con el metabolismo de los carbohidratos y de acuerdo con las cuales el embrión es esencialmente catabólico en los primeros días de germinación. En lugar de medir niveles de carbohidratos y actividades enzimáticas, tal como se realizó en la presente investigación, otro enfoque de utilidad podría ser la obtención de extractos enzimáticos e incubación en presencia de maltosa, sacarosa y almidón para ver la velocidad de producción de glucosa.

Otro de los resultados obtenidos es la presencia de actividad amilolítica en el embrión; esta actividad enzimática es tan importante como en el endospermo durante los cuatro primeros días de germinación. La actividad de amilasas ha sido ampliamente estudiada en el endospermo, pero en el embrión requiere más investigación. Este trabajo plantea la necesidad de investigar si el mecanismo de liberación de amilasas en el embrión es diferente que en el endospermo y si la aparición de esta actividad enzimática

ca requiere la síntesis de proteínas. Los experimentos en caminados a la solución de este problema podrían realizarse utilizando alfa-amanitina ó actinomicina-D que inhiben la transcripción y si el incremento de actividad se origina a un nivel post-transcripcional, podrían emplearse inhibidores como cordicepina o cicloheximida.

- Abdul-Baki, A.A. Relationship of glucose metabolism to germinability and vigor in barley and wheat seeds. *Crop. Sci.* (1969) 9, 732-738.
- Aguado, A.T., Palacios de la Rosa, G. y Muñoz, A.O. H28 - Nuevo híbrido temporalero para valles altos. *Agri-cultura Técnica en México.* (1963) II (4), 146-147.
- Beevers, H. Metabolic production of sucrose from fat. *Nature.* (1961) 191, 433-436.
- Bergmeyer, H.U. and Klotzsch, H. Sucrose. *Methods of Enzy-matic Analysis.* Acad. Press. N.Y. (1963), 99-102.
- Bernfeld, P. Amylases alfa and beta. *Methods Enzymol.* - Acad. Press. N.Y. (1955) 1, 149-158.
- Blanco, L.E. Niveles de Enzimas Amilolíticas en la Germinación del Maíz. Tesis de Licenciatura UNAM, México (1978).
- Brammer, G.L., Rouguie, M.A. and French D. Distribution of alfa-amylase-resistant regions in the glycogen molecule. *Carbohyd. Res.* (1972) 24, 343-354.
- Creech, R.G. Carbohydrate synthesis in maize. *Advances - Agron.* (1968) 20, 275-322.
- Dalby, A., and Tsai, C.Y. Lysine and tryptophan increases during germination of cereal grains. *Cereal Chem.* - (1976) 53, 222-226.
- Delmer, D.P. The purification and properties of sucrose synthetase from etiolated Phaseolus Aureus seedlings *J. Biol. Chem.* (1972) 247, 3822-3828.
- Dure, L.S. Site of origin and extent of activity of amylases in maize germination. *Plant Physiol.* (1960) 35, 925-934.
- Dubois, M., Grilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* (1956) 28, 350-356.

- Eldan, M. and Mayer, A.M. Acid invertase in germinating - Lactuca Sativa seeds: evidence for de novo synthesis. Phytochem. (1974) 13, 389-395.
- Edelman, J., Shibko, S.I. and Keys, A.J. The role of the scutellum of cereal seedlings in the synthesis and transport of sucrose. J. Exptl. Botany (1959) 10, 178-189.
- Filner, P. and Varner J.E. A test for de novo synthesis - of enzymes: Density labeling with H_2O^{18} of barley - alfa amylase induced by gibberellic acid. Proc. Nat. Acad. Sci. (1967) 58, 1520-1526.
- Gaines, T.P. Automated determination of reducing sugars - total sugars and starch in plant tissue from one - weighed sample. Journal of the A.O.A.C. (1973) 56, 1419-1424.
- Gepstain, S. and Ilan, I. Does osmotic regulation of amylase synthesis in barley endosperm exist? Plant and Cell Physioll. (1974) 15, 399-402.
- Goldstein, L.D. and Jennings, P.H. The occurrence and development of amylase enzymes in incubated, de-embryo-nated maize kernels. Plant Physiol. (1975) 55, 893-898.
- Graham D. A model for starch breakdown in higher plants. Phytochemistry (1974) 13, 1341-1346.
- Ingle, J. Beevers, L., and Hageman, R.H. Metabolic Changes associated with the germination of corn. Plant Physiol. (1964) 39, 735-740.
- Jacobsen, J.W. and Varner, J.L. Gibberellic acid induced synthesis of protease by isolated aleurone layers of barley. Plant Physiol. (1967) 42, 1596-1600.
- Jeffers, H.C. and Rubenthaler, G.L. Effects of gibberellic acid on the amylase activity of malted wheat - and comparison of methods for determining amylase activity. Cereal Chem. (1974) 51, 772-779.
- Jones, R.L. and Armstrong J.E. Evidence for osmotic regulation of hydrolytic enzyme production in germina--

- ting barley seeds. *Plant Physiol.* (1971) 48, 137-142. -
- Kesler, R.B. Rapid quantitative anion-exchange chromatography of carbohydrates. *Anal. Chem.* (1967) 39 1416-1422. -
- Labanssat, E. Diseño y preparación de una columna de cromatografía de afinidad para la separación de distintas formas de amilasas. Tesis de Licenciatura UNAM, México (1975). -
- Leloir, L.F. and Cardini, C.E. The biosynthesis of sucrose. *J. Am. Chem. Soc.* (1953) 75, 6084. -
- Longo, G.P. and Longo, G.P. The development of glyoxysomes in maize scutellum. *Plant Physiol.* (1970) 46, 599-604. -
- Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. (Eds.) The germination of seeds. Pergamon Press. Oxford (1975). -
- Mayer, A.M. Control of seed germination. *Ann. Rev. Plant Physiol.* (1974) 25, 167-193. -
- National Academy of Sciences. Original strains of corn I. Nat. Res. Council (1954). Washington, D.C. -
- Nomura, T., and Akazawa, T. Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds V. Sucrose phosphate synthetase in the scutellum. *Plant and Cell Physiol.* (1974) 15, 477-483. -
- Olered, R. Alfa amylase isozymes in cereals and their influence on starch properties. *Cereal Res. Comm.* (1975) 4, 195-199. -
- Paleg, L.G. Physiological effects of gibberellic acid I. On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. *Plant Physiol.* (1960) 35, 293-299. -
- Palmiano, E.P. and Juliano, B.O. Biochemical changes in the rice grain during germination. *Plant Physiol.* (1972) 49 751-756. -
- Pérez, C.M., Perdon, A.A., Resurrección, A.P., Villarreal, R.M., and Juliano, B.O. Enzymes of carbohydrate metabolism in the developing rice grain. *Plant Physiol.* (1975) 56, 579-583. -

- Preiss, J. and Kosuse, T. Regulation of enzyme activity - in photosynthetic systems. *Ann. Rev. Plant Physiol.* (1970) 21, 433-466.
- Radley, M. Site of production of gibberellin-like substances in germinating barley embryos. *Planta* (1967) 75, 164-171.
- Sakri F.A.K. and Shannon J.C. Movement of ¹⁴C-labeled sugars into kernels of wheat (*Triticum Aestivum* L.) - *Plant Physiol.* (1975) 55, 881-889.
- Shannon, J.C. Carbon-14 distribution in carbohydrates of immature *Zea Mays* kernels following 14 CO₂ treatment of intact plants. *Plant Physiol.* (1969) 43, 1215-1220.
- Tanaka, Y., Tomoko, I. and Akazawa T. Enzymic Mechanism - of starch breakdown in germinating rice seeds. - *Plant Physiol.* (1970) 46, 650-654.
- Turner, J.F. and Turner, D.H. The regulation of carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* (1973) 26, 159-186.
- Tsai, C.Y. and Nelson, O.E. Phosphorylases I and III of - maize endosperm. *Plant Physiol.* (1968) 43, 103-112.
- Walborg, E.F. Jr. and Lantz, R.S. Separation and quantitation of saccharides by ion-exchange chromatography utilizing boric acid glycerol buffers. *Anal. Biochem.* (1968) 22, 123-133.
- Wellhausen, E.J., Roberts, L.M. y Hernández, X.E. Razas - de Maíz en México (1951) 79-83.
- Williams, P.C., Kuzina, F.D. and Hlynka, I. A rapid colorimetric procedure for estimating the amylose - content of starches and flours. *Cereal Chem.* (1970) 47, 411-420.
- Zimmerman, M.H. Transport in the phloem. *Ann. Rev. Plant Physiol.* (1960) 11, 167-190.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

D.O. a 490 nm

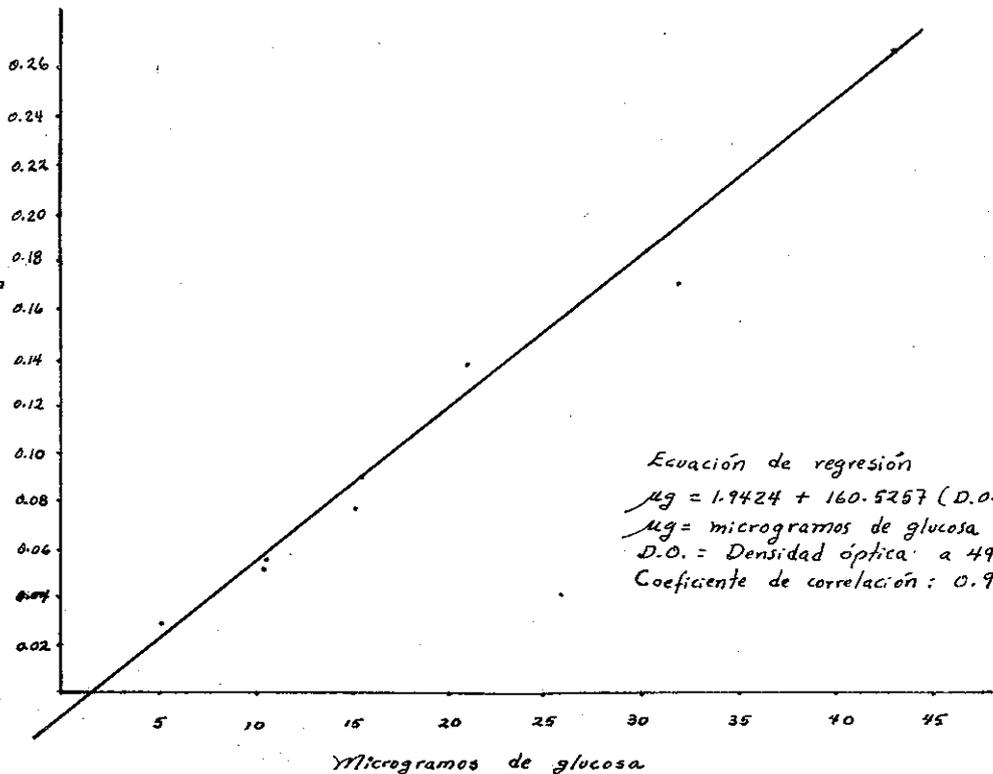


Figura 1.- Curva tipo de glucosa. Diferentes cantidades de glucosa se hicieron reaccionar con el reactivo de fenol-sulfúrico (a un ml de fenol al 5% y 2 ml de muestra, se les agregan 5 ml de ácido sulfúrico concentrado), los valores mostrados son promedio de 3 repeticiones.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

% en base
seca.

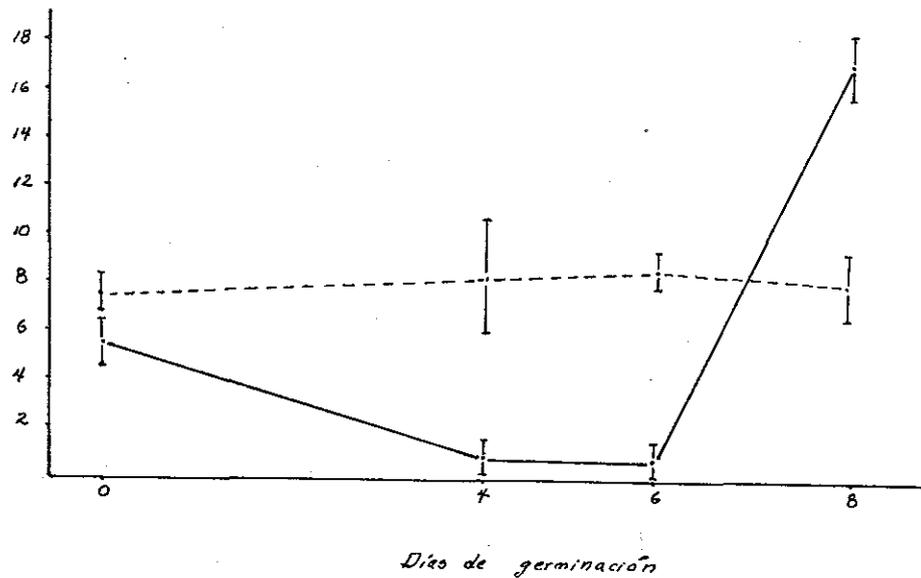


Figura 2.- Producción de carbohidratos solubles durante la germinación del maíz H28. La metodología para la extracción de los carbohidratos, se describe en materiales y métodos. Las barras verticales indican desviación estándar. (—) carbohidratos solubles en agua. (-----) polisacáridos solubles en agua.

| Revelador | O | O | FA | O | FA | O | FA |
|-----------|-------------|-------------|-------------|----------------|----------------|---------------|--------------|
| | Embrión (0) | Embrión (6) | Embrión (6) | Endosperma (0) | Endosperma (6) | Sacarosa pura | Glucosa pura |
| | ● | ● | ● | | ● | ● | ● |

Figura 3.- Cromatografía en papel de carbohidratos solubles. El método empleado consiste en eluir los carbohidratos con isopropanol-agua (4:1), el revelador empleado para sacarosa es un reactivo de orcinol-HCl (O) y el revelador de glucosa es ftalato de anilina (FA). Entre paréntesis se indica el tiempo de germinación en días.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

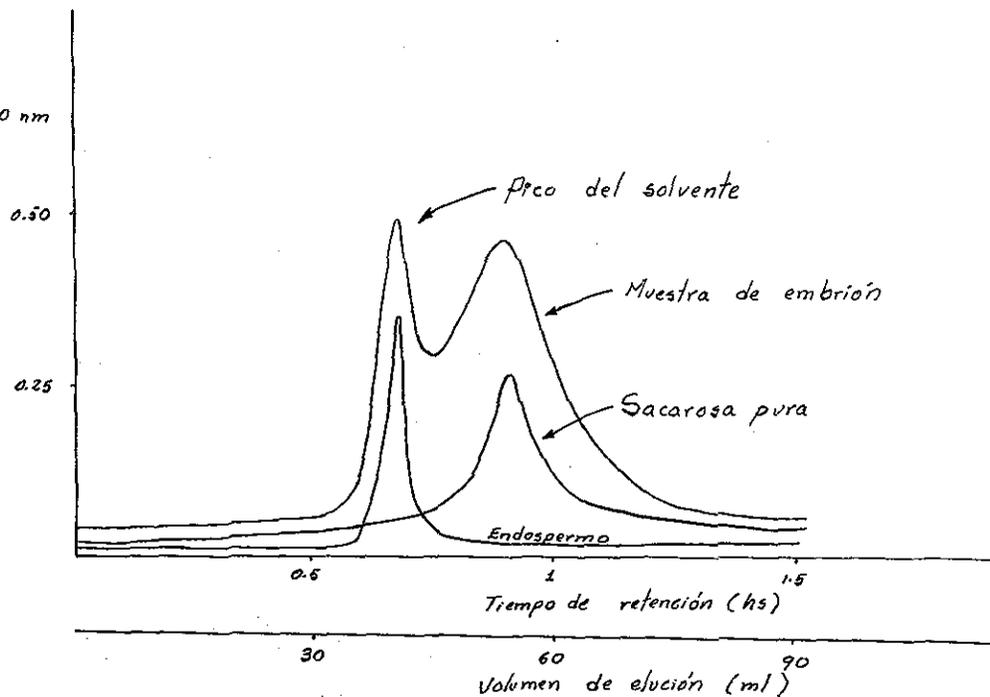


Figura 4.- Detección de sacarosa en embrión y endospermo de maíz H28. Se emplearon maíces de 6 días de germinación. El eluyente empleado fué ácido bórico 0.1 M pH 8, las características de la columna se describen en la tabla 4. Se tomaron 5 mg de tejido seco y los carbohidratos solubles se extrajeron con una solución de cloroformo-agua-metanol (4:3:13) hasta completar un volumen de 10 mililitros, del cual se tomaron alícuotas de 0.35 mililitros para aplicar en la columna.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

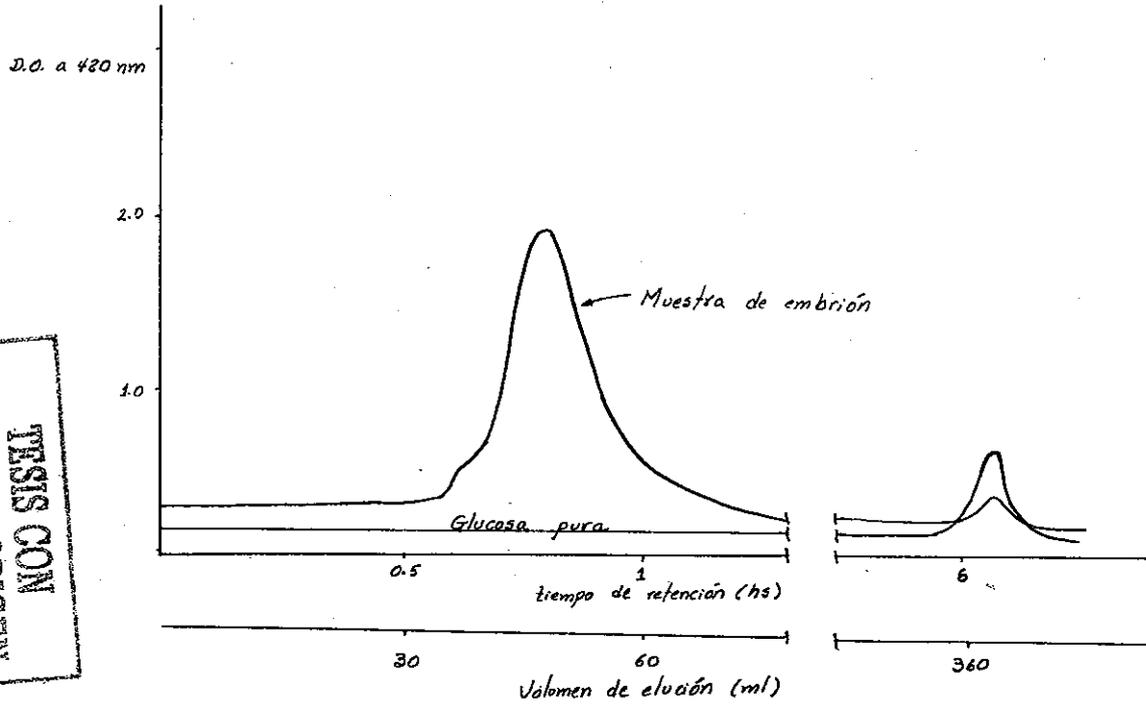


Figura 5 - Detección de glucosa en embrión de maíz H28. Se emplearon maíces de 3 días de germinación. El eluyente utilizado fué un gradiente de ácido bórico--NaCl pH 8 - 9.5, según se describe en la tabla 4. La gráfica obtenida corresponde a un embrión de 126.6 miligramos.

TESIS CON
PATA DE ORIGEN

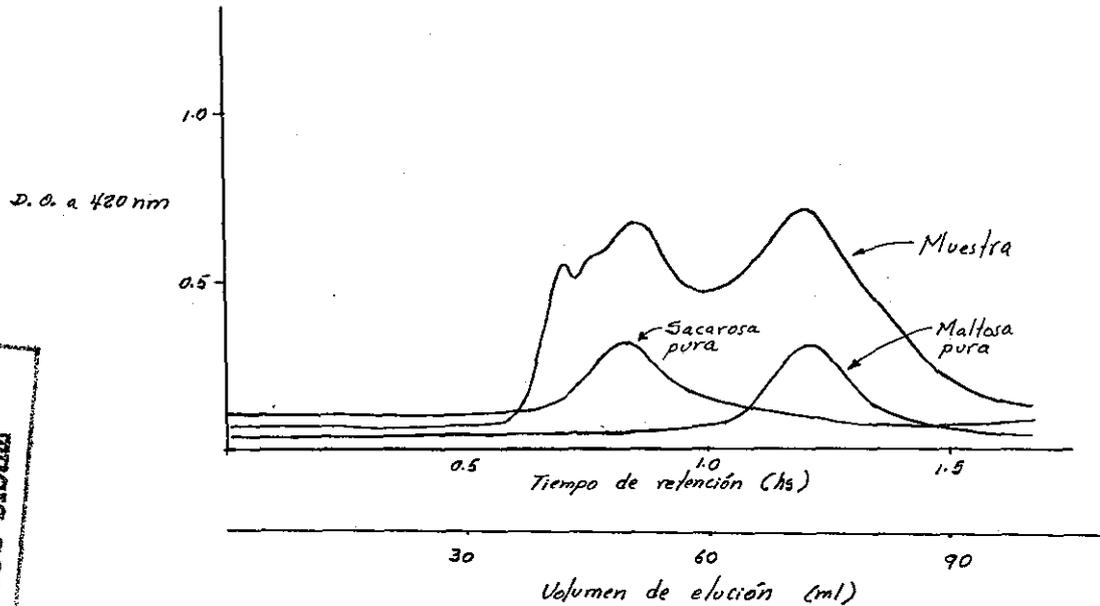
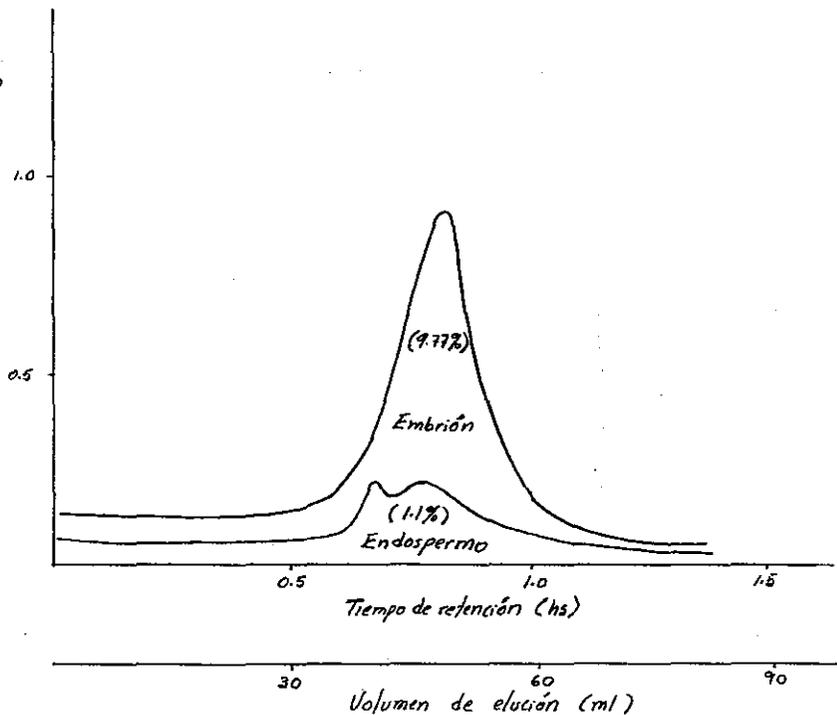


Figura 6.- Detección de maltosa y sacarosa en el endospermo del maíz H28 de 3 días de germinación. La gráfica obtenida corresponde a un endospermo con peso de 426.5 mg. Las características de la columna y el gradiente formado a través de ella, se describen en la tabla 4.

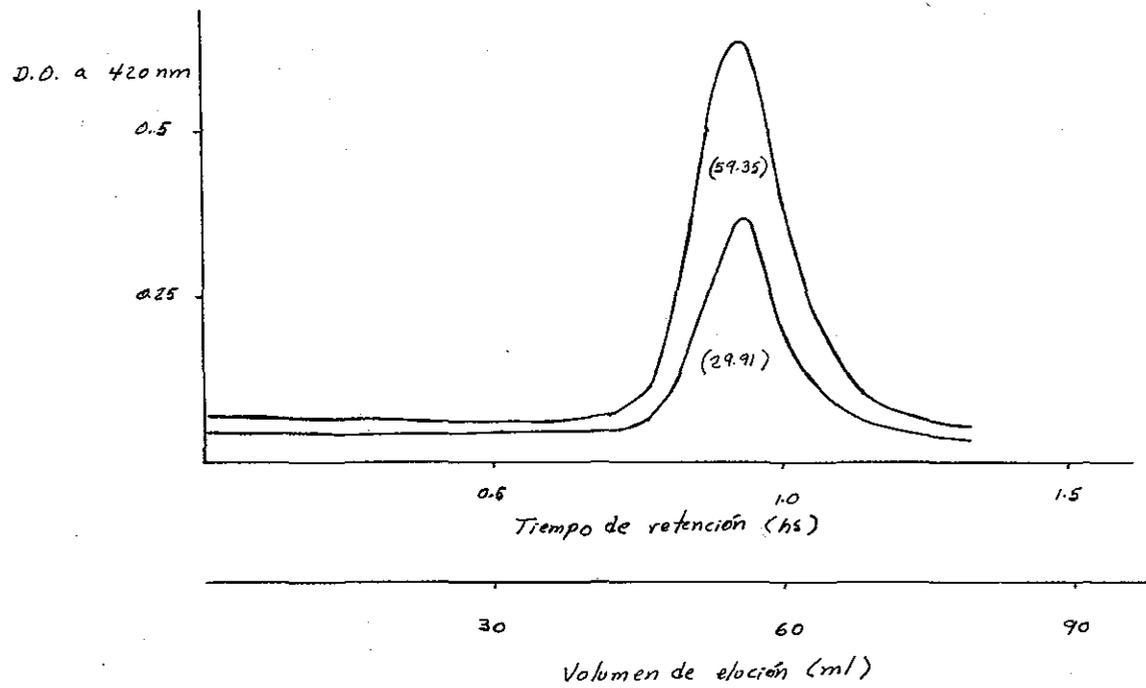
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

D.O. a 420 nm



64

Figura 7.- Comparación de los picos de sacarosa producidos por el embrión y el endospermo de maíz H28 sin germinar. Entre paréntesis se presenta el porciento en base seca. Las características de la columna se describen en la tabla 4. El eluyente empleado - fué una solución de ácido bórico 0.1 M pH 8.

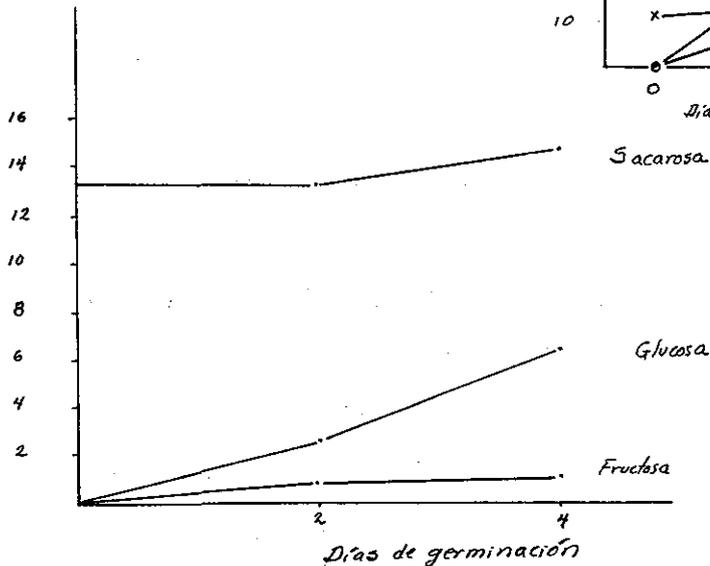


85

Figura 8.- Areas bajo la curva del pico de sacarosa obtenido por cromatografía de intercambio iónico. La superficie se determinó en un medidor automático de área modelo AAM-5 de la marca Hayashi Denko. Entre paréntesis se indica el área en cm^2 , para el pico más pequeño se aplicaron 0.1 ml y para el pico mayor 0.2 ml de un extracto embrionario de maíz H28 obtenido con una solución de cloroformo-agua-metanol (4:3:13).

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

% en base seca



% en base seca

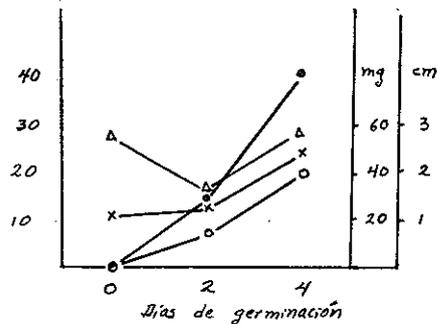


Figura 9.- Contenido de carbohidratos solubles en agua en embrión de --
 maíz Cristalino de Chihuahua. Los resultados se reportan como por ciento
 en base seca. Al margen se presentan otras variables del grano durante
 la germinación: (o) longitud de la plúmula, (*) longitud de la radícula,
 (x) peso por embrión, (Δ) componentes extraíbles con cloroformo-agua-me-
 tanol.

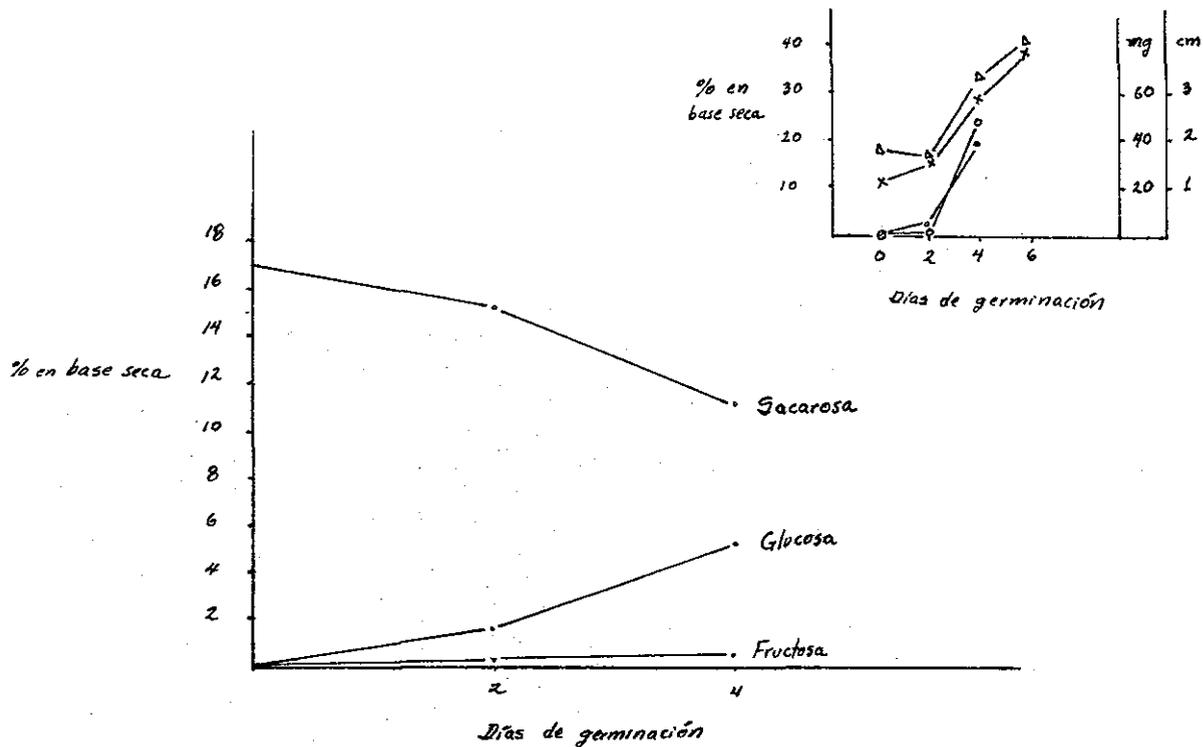


Figura 10.- Contenido de carbohidratos solubles en agua en el embrión de maíz Dulce de Jalisco. Los resultados se reportan como por ciento - en base seca. Al margen se presentan otras variables del grano de --- maíz durante la germinación: (O) longitud de la plúmula, (•) longitud de la radícula, (x) peso del embrión, (Δ) componentes extraíbles con cloroformo-agua-metanol.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

D.O. a 420nm

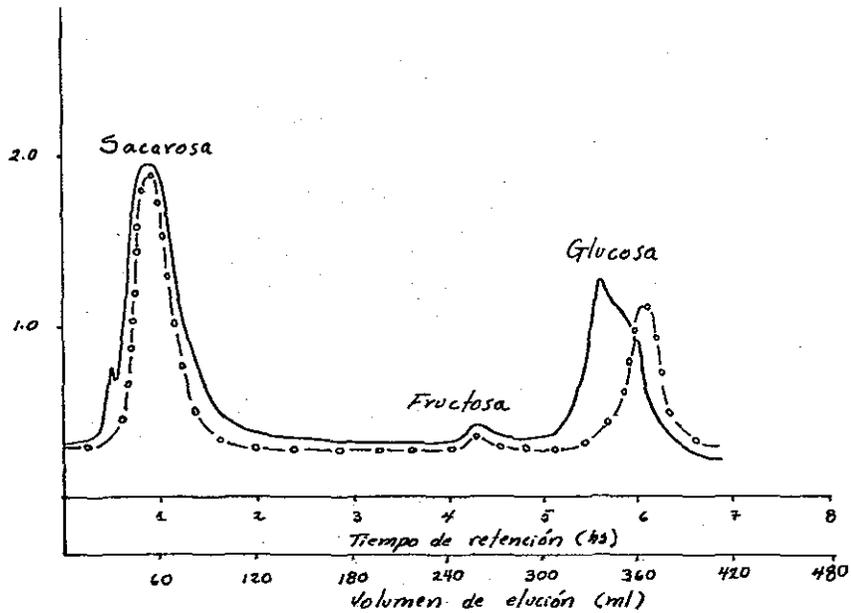


Figura 11.- Cromatografía de intercambio iónico de una muestra de embrión de maíz Dulce de Jalisco. Los picos en orden de aparición son sacarosa, fructosa y glucosa. (---) 4 días de germinación, (—) 6 días de germinación.

D.O. a 420 nm

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

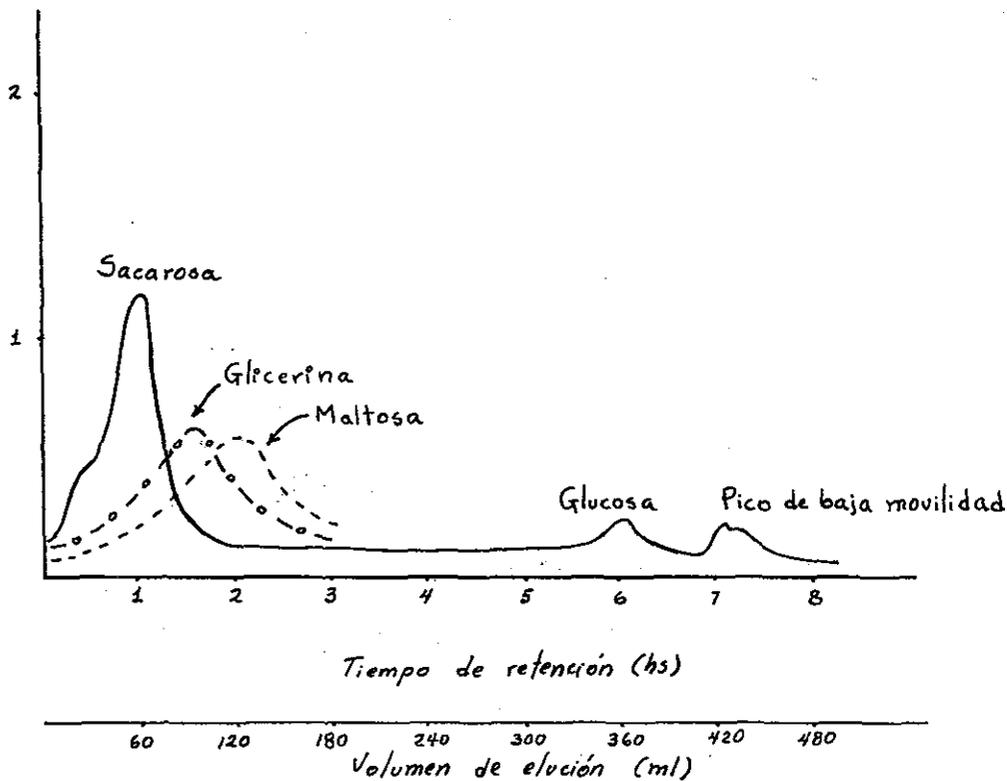


Figura 12.- Comparación del pico de baja movilidad de una muestra de embrión, con los picos producidos por muestras de maltosa (-----) y glicerina (- o - o - o -). Se presenta el cromatograma obtenido con una muestra de embrión de maíz H28 de dos días de germinación.

TESIS CON
PALLA DE ORIGEN

% en base seca

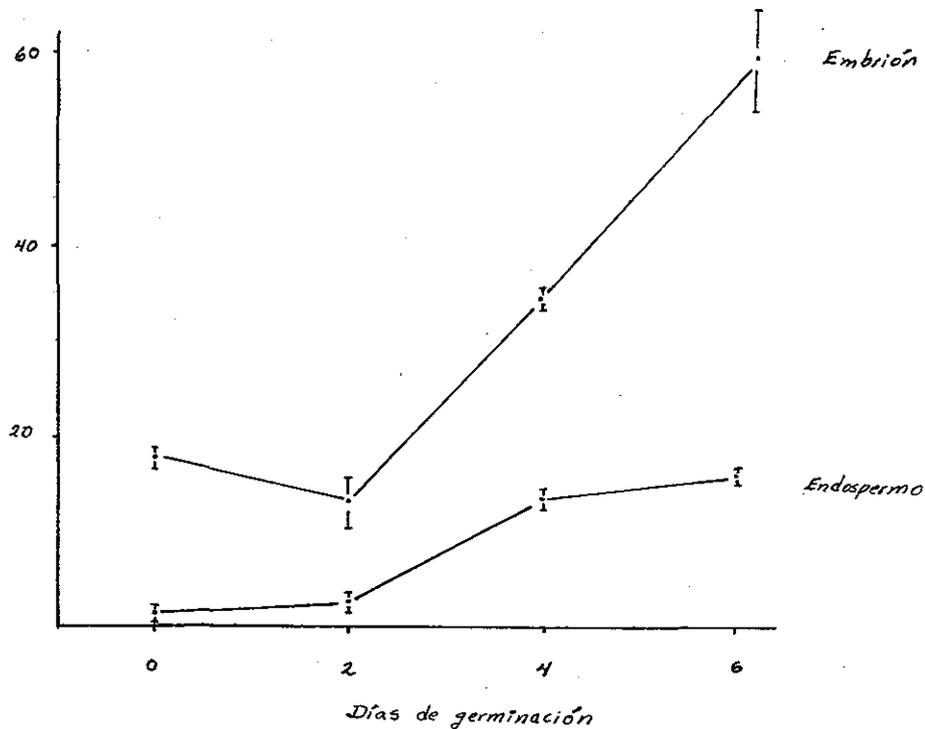


Figura 13.- Medición de carbohidratos solubles totales en embrión y en endospermo de maíz H28. La extracción se realizó a los tiempos indicados con una solución de cloroformo-agua-metanol (4:3:13) y la determinación se hizo empleando el método de fenol sulfúrico.

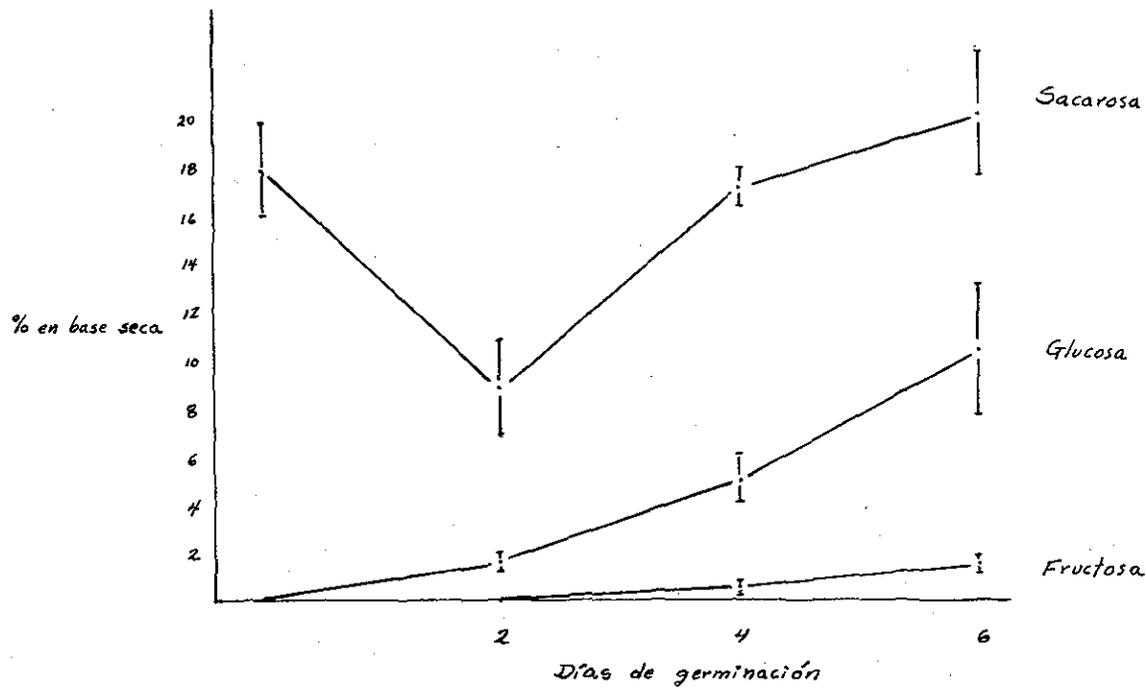


Figura 14.- Contenido de carbohidratos solubles en embrión de maíz H28. Los resultados se expresan como porcentaje en base seca.

17

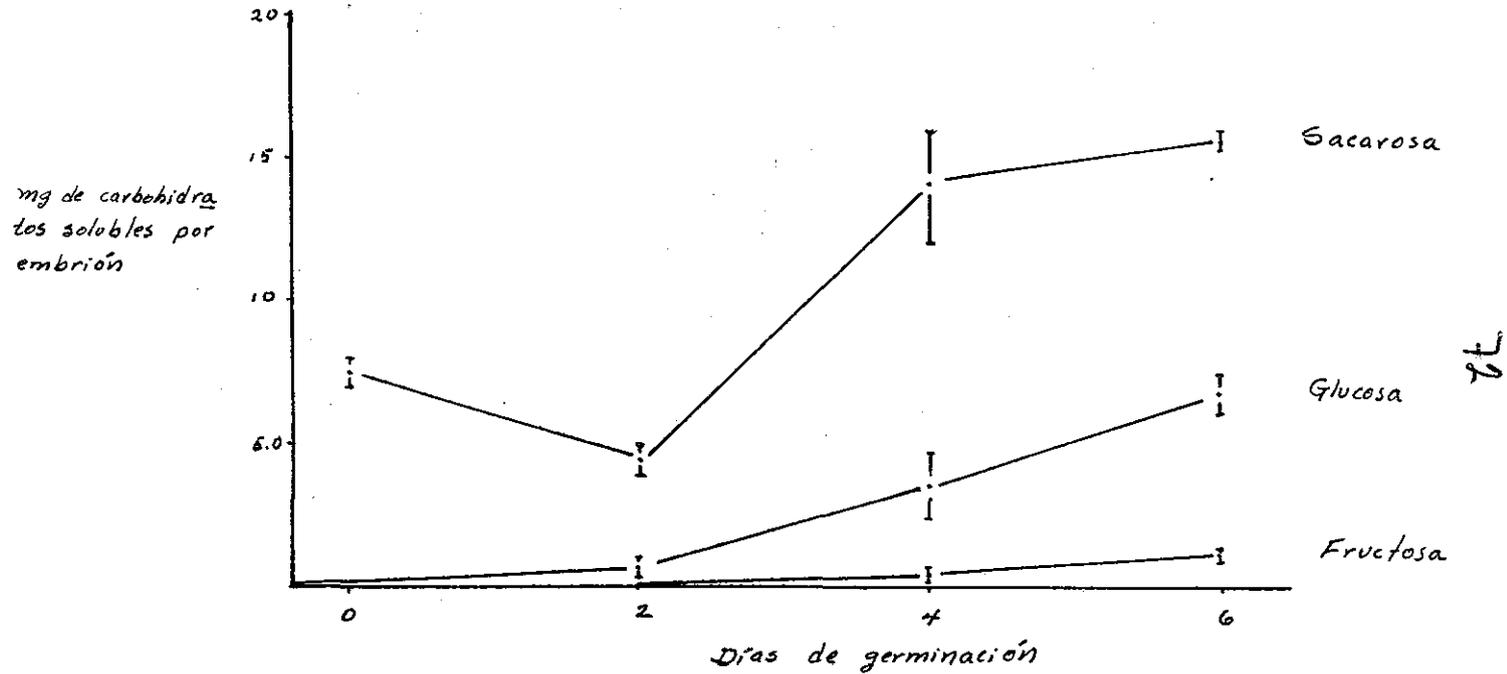


Figura 15.- Contenido de carbohidratos solubles en el embrión de maíz H28. Las barras verticales indican desviación estándar. Los resultados se expresan como miligramos de carbohidrato soluble por embrión.

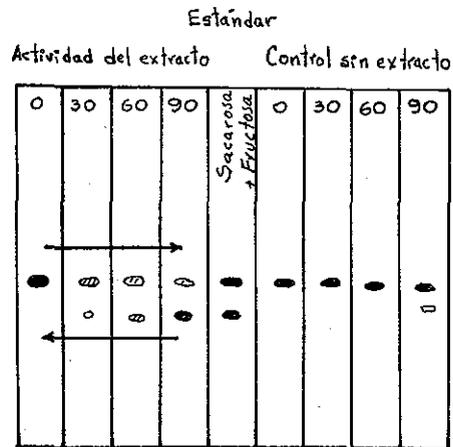


Figura 17.- Experimento para detectar actividad de invertasa en embrión de maíz H28 de un día de germinación. El centro del embrión se homogenizó con 5 mililitros de una solución reguladora de acetatos 0.1 M, pH 4.6 y se incubó a 50°C durante los tiempos indicados. Se tomaron 25 ml del medio y se colocaron en el papel de cromatografía para la detección de fructosa y sacarosa. Las flechas indican disminución en la intensidad del color producido con un revelador de orcinol-HCl.

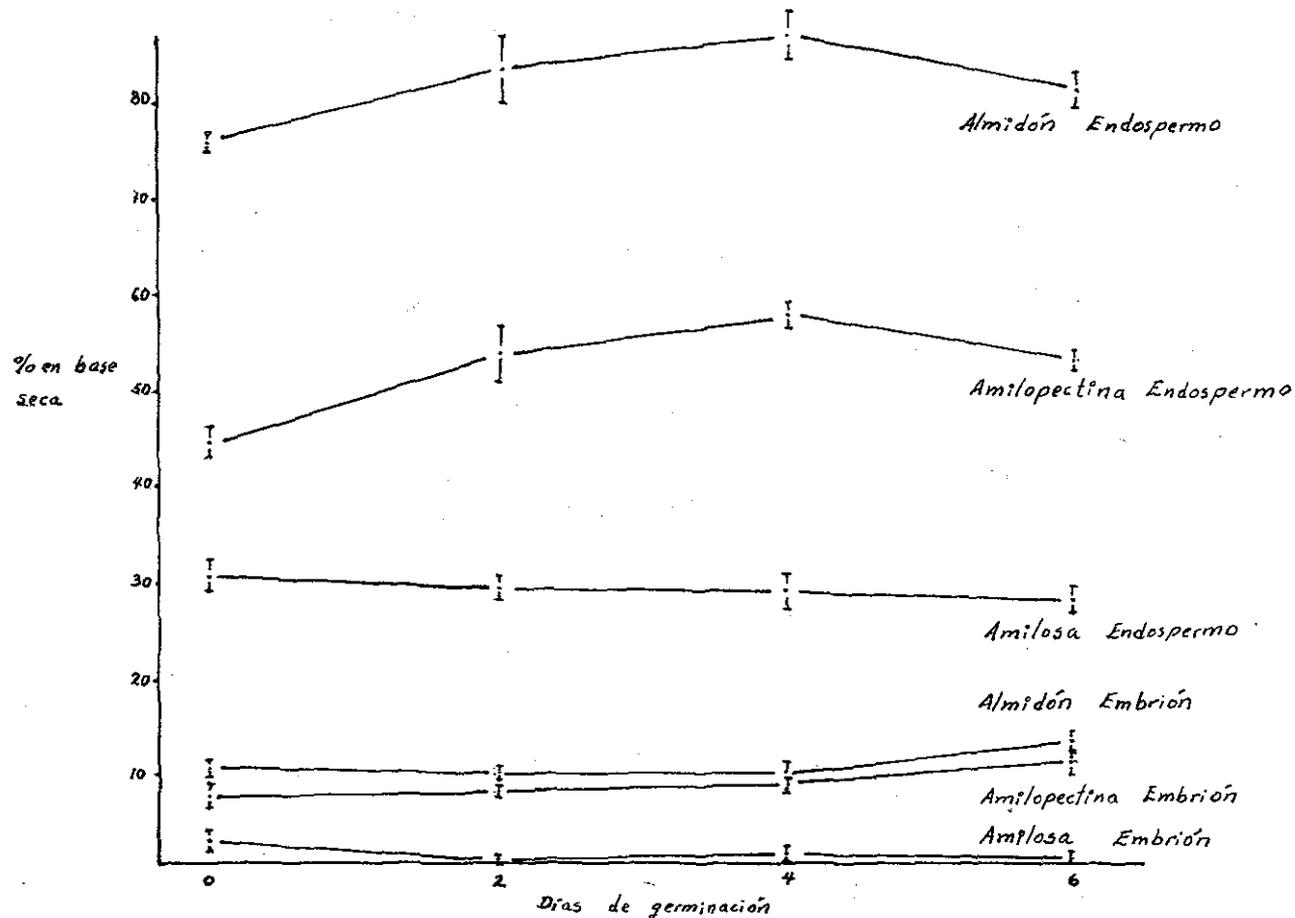
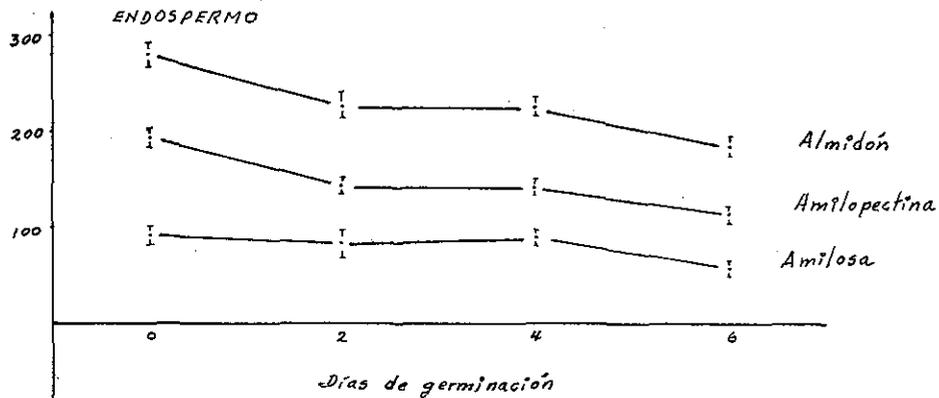


Figura 18.- Medición de polisacáridos en embrión y endospermo de maíz H28 durante la germinación. Los resultados se reportan como porcentaje en base seca. Las barras verticales indican desviación estándar.

ht

TESIS CON
 VALIA DE ORIGEN

mg por endospermo



mg por embrión

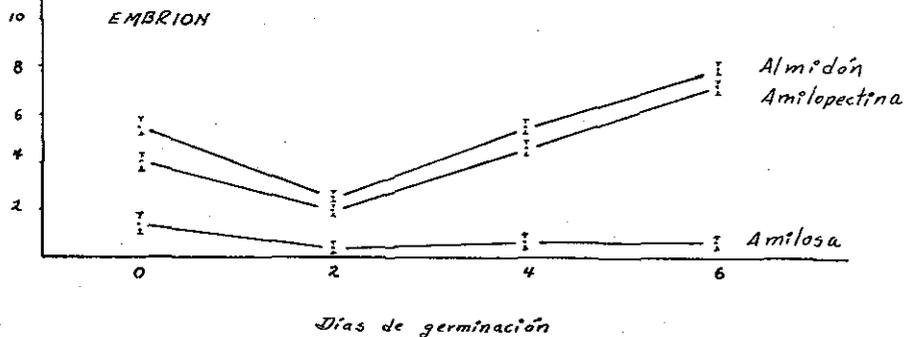


Figura 19.- Niveles de almidón en embrión y endospermo de maíz H28 durante la germinación. Los resultados se reportan como miligramos por embrión o por endospermo. Las barras verticales indican desviación estándar.

52

TESIS CON
PALLA DE ORIGEN

mg por tejido por minuto

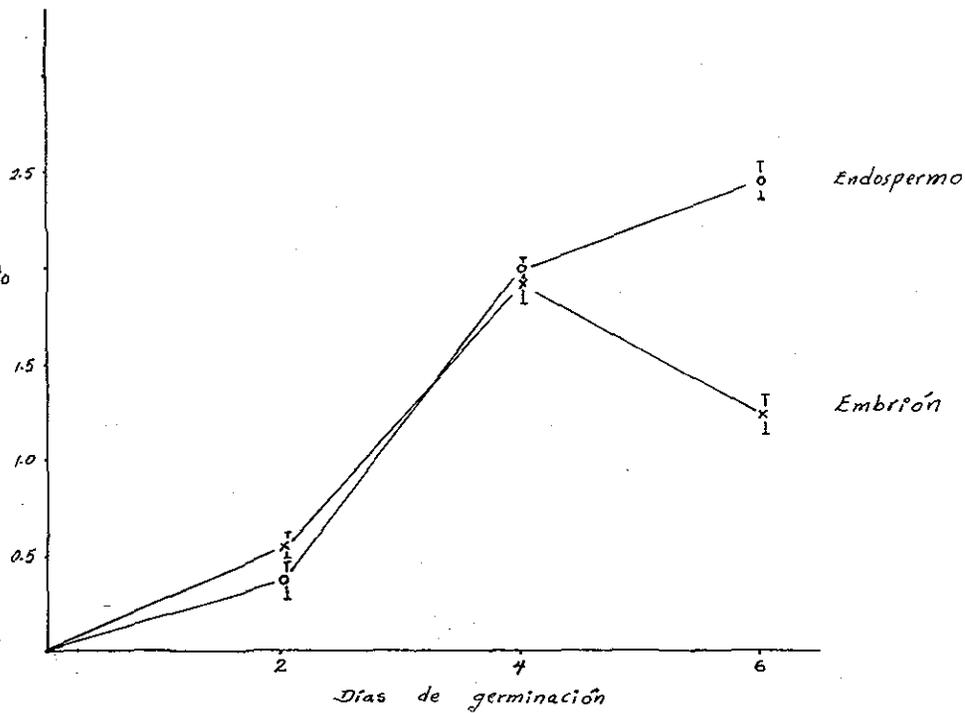


Figura 20.- Medición de actividad de amilasas durante la germinación del grano de maíz H28. Los resultados se reportan como miligramos de amilosa que desaparecen por minuto por embrión o por endospermo. Las barras verticales indican desviación estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mg por endospermo
por minuto

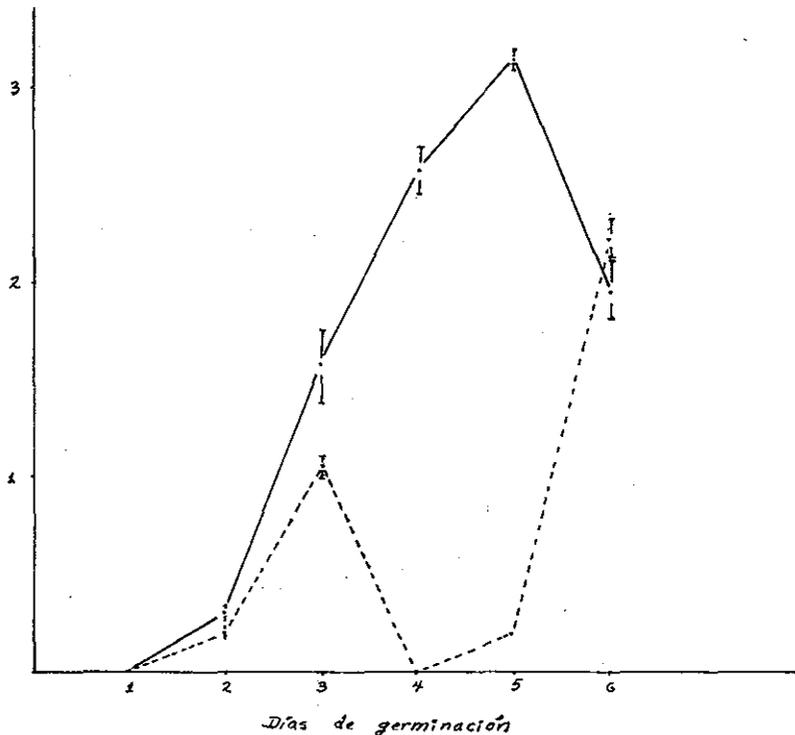


Figura 21.- Actividad de amilasas en el endospermo durante la germinación del maíz H28. La extracción se realizó con una solución de succinato 40 mM pH 5.0 y la determinación se realizó según se describe en materiales y métodos. (—) Enzimas estables al calor, (---) enzimas sensibles al calor.

TESIS CON
PALILADE ORICEN

mg por embrión
por minuto

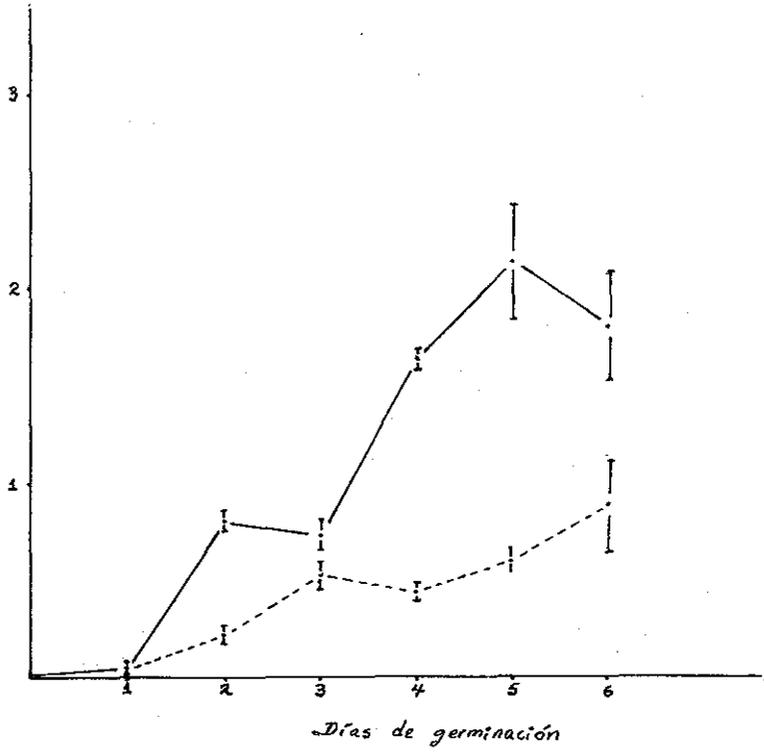


Figura 22.- Actividad de amilasas en el embrión durante la germinación del maíz H28. La extracción se realizó con una solución de -- succinato 40 mM, pH 5.0 y la determinación se efectuó según se describe en materiales y métodos. (—) Enzimas estables al calor, (- - - -) enzimas sensibles al calor.

| T E J I D O | % EN BASE SECA |
|------------------------|---------------------|
| 1.- Raíz principal | 34.73 (\pm 0.41) |
| 2.- Raíces adventicias | 59.18 (\pm 4.32) |
| 3.- Plúmula | 27.57 (\pm 0.16) |
| 4.- Escutelo | 18.56 (\pm 4.30) |
| 5.- Endospermo | 5.2 (\pm 1.10) |
| 6.- Cutícula | 5.00 (\pm 0.89) |

Tabla 1.- Medida de carbohidratos solubles en diferentes tejidos del grano de maíz H28 a los 3 días de germinación. Las determinaciones se realizaron por el método de fenol-sulfúrico; los números entre paréntesis son desviaciones estándar.

| Carbohidratos solubles | Microgramos por cm ² |
|---------------------------|------------------------------------|
| Fructosa | 6.24 (\pm 1.19) |
| Maltosa | 4.06 (\pm 0.55) |
| Sacarosa | 3.11 (\pm 0.06) |
| Glucosa | 1.88 (\pm 0.44) |

Tabla 2.- Cálculo de la cantidad de microgramos de carbohidrato por centímetro cuadrado de área obtenida en el registrador del equipo automático de cromatografía para carbohidratos solubles. Los números entre paréntesis indican desviación estándar de tres repeticiones.

| Tejido | % de sacarosa |
|--------------------|---------------|
| plúmula | 6.23 |
| Epicótilo | 11.88 |
| Centro del embrión | 15.46 |
| Raíces | 15.18 |

Tabla 3.- Contenido de sacarosa en diversos tejidos embrionarios de maíz H28, 6 días de germinación. Los resultados se reportan como porcentaje en base seca.

2

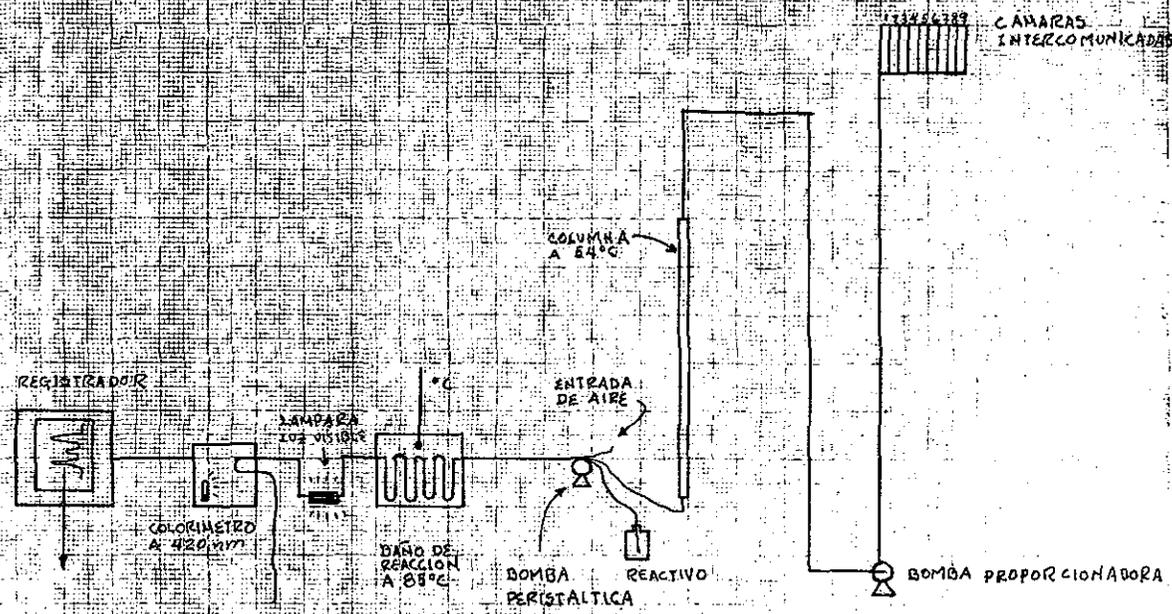
Presión: 250 psi
Flujo: 1.0 ml/min
Altura de la columna 75 cm
Temperatura de la columna: 54°C
Temperatura del baño de reacción: 85°C
Resina: S-Cromo Beads-Technicon
Reactivo: Orcinol al 0.1% en H₂SO₄ al 70%
Fuerza iónica inicial: 0.005562
Fuerza iónica final: 0.330070
Soluciones stock para formar el eluyente:
Solución I.- Acido bórico 0.1 M pH 8 fuerza iónica 0.005562
" II.- Acido bórico 0.1 M, NaCl 0.05 M pH 8 fuerza iónica 0.055562
" III.- Acido bórico 0.1 M, NaCl 0.1 M pH 8 fuerza iónica 0.105562
" IV.- Acido bórico 0.2 M pH 8 fuerza iónica 0.130070
" V.- Acido bórico 0.2 M, NaCl 0.2 M pH 9.5 fuerza iónica 0.330070

Eluyente:

Cámara 1.- 50 ml solución I, fuerza iónica de 0.005562
" 2.- 50 ml solución I, fuerza iónica de 0.005562
" 3.- 25 ml solución I + 25 ml solución II, fuerza iónica de la mezcla 0.030562
" 4.- 33.3 ml solución III + 16.7 ml solución IV, fuerza iónica de la mezcla: 0.074130
" 5.- 25 ml solución IV + 25 ml solución V, fuerza iónica de la mezcla: 0.131366
" 6.- 25 ml solución IV + 25 ml solución V, fuerza iónica de la mezcla: 0.131366
" 7.- 25 ml solución IV + 25 ml solución V, fuerza iónica de la mezcla: 0.131366
" 8.- 50 ml solución V, fuerza iónica de 0.330070
" 9.- 50 ml solución V, fuerza iónica de 0.330070

Tabla 4.- Condiciones de trabajo del analizador automático de - carbohidratos marca Technicon. Las 9 cámaras que forman el gra diente, están dispuestas según el esquema adjunto.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



Esquema 1.- Representación gráfica del Analizador Automático de Carbohidratos marca Technicon. La composición de las soluciones que se colocan en las 9 cámaras intercomunicadas, se describe en la tabla 4. La temperatura de la columna se mantiene por medio de un baño de recirculación de agua que no se muestra en el esquema. Todas las demás condiciones del sistema se describen en la tabla 4.