

18  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACION DEL COMPORTAMIENTO DEL  
ALMIDON DURANTE EL DESARROLLO DE SEMILLAS  
DE LA FAMILIA CONVULVULACEAE DESDE ANTESIS  
HASTA SEMILLA MADURA DESHIDRATADA Y  
DURANTE LAS PRIMERAS FASES DE GERMINACION

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :  
HECTOR MANUEL BECERRIL YEPEZ

MEXICO, D. F.

1991

FALLA DE ORIGEN



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

# I N D I C E

	Pág
I RESUMEN.....	5
II INTRODUCCION.....	3
III ANTECEDENTES.....	5
A.-Las malezas o malas hierbas.....	5
B.-Desarrollo de las semillas de Angiospermas.....	14
C.-Carbohidratos de reserva en semillas.....	21
IV OBJETIVOS.....	36
V JUSTIFICACION.....	38
VI MATERIALES Y METODOS.....	40
A.-Siembra de semillas y obtención del material biológico.	
1.-Colecta e incremento del material biológico..	40
2.-Obtención de las semillas en desarrollo de <u>Ipomoea purpurea</u> .....	41
3.-Obtención del material en etapas de germinación de <u>Ipomoea purpurea</u> .....	42
4.-Obtención de las semillas en desarrollo de <u>Ipomoea nil</u> .....	42
B.-Extracción de almidón.....	43
C.-Extracción de lípidos.....	48
D.-Determinación de la cantidad de solución de yodo-yoduro de potasio para saturar al almidón.....	49
E.-Cuantificación del almidón de las fracciones	

enriquecidas.....	50
F.-Espectros de absorción de las fracciones enriquecidas de almidón.....	55
G.-Análisis exploratorio de los datos.....	55
VII RESULTADOS.....	58
A.-Evaluación de las técnicas de extracción y cuantificación de los extractos enriquecidos de almidón.....	58
B.-Extracción de lípidos.....	62
C.-Determinación de la cantidad de solución de yodo-yoduro de potasio necesaria para saturar al almidón.....	65
D.-Análisis del crecimiento de frutos y semillas en desarrollo de <u>Ipomoea purpurea</u> .....	75
E.-Cuantificación del almidón de las fracciones enriquecidas de frutos, semillas en desarrollo y germinados de <u>Ipomoea purpurea</u> .....	84
F.-Cuantificación del almidón de la fracción enriquecida de los frutos y las semillas de <u>Ipomoea nil</u> .....	104
G.-Espectros de absorción de los extractos enriquecidos de almidón.....	110
VIII DISCUSION.....	114
IX CONCLUSIONES.....	122
X BIBLIOGRAFIA.....	124

## INDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1.- Rutas de la síntesis de almidón y sacarosa en las células fotosintéticas.....	26
Figura 2.- Obtención de la fracción enriquecida de almidón del material biológico.....	47
Figura 3.- Método de cuantificación de la cantidad de almidón.....	54
Figura 4.- Formación del complejo yodo-almidón del almidón soluble para análisis de Merck y del almidón de papa comercial.....	61
Figura 5.- Comparación de la formación de complejos yodo-almidón tratados con diferentes solventes para eliminar los lípidos.....	64
Figura 6.- Patrón de comportamiento del complejo yodo-almidón.....	68
Figura 7.- Densidad óptica máxima en relación a la concentración de almidón.....	70
Figura 8.- Porcentajes de saturación de los complejos yodo-almidón.....	72
Figura 9.- Cantidad de solución $I_2$ -KI en relación a la concentración de almidón.....	74

Figura 10.- Incremento en el peso fresco durante el desarrollo de los frutos de <u>Ipomoea purpurea</u> .....	79
Figura 11.- Patrón de comportamiento que presentan las semillas líder de plantas de <u>Ipomoea purpurea</u> de la cosecha de Octubre.....	81
Figura 12.- Análisis de regresión del crecimiento de semillas de <u>Ipomoea purpurea</u> .....	83
Figura 13.- Cantidad de almidón con respecto al tiempo de desarrollo en plantas de <u>Ipomoea purpurea</u> cosecha de Octubre.....	91
Figura 14.- Cantidad de almidón con respecto al peso fresco en frutos y semillas de <u>Ipomoea purpurea</u> Cosecha de Octubre.....	93
Figura 15.- Proporción de almidón con respecto al incremento en peso fresco en frutos y semillas de <u>Ipomoea purpurea</u> cosecha de Octubre.....	95
Figura 16.- Cantidad de almidón con respecto al tiempo de desarrollo en plantas de <u>Ipomoea purpurea</u> cosecha de Noviembre.....	97
Figura 17.- Cantidad de almidón con respecto al peso fresco en frutos y semillas de <u>Ipomoea purpurea</u> Cosecha de Noviembre.....	99
Figura 18.- Proporción de almidón con respecto al incremento en peso fresco en frutos y semillas de	

<u>Ipomoea purpurea</u> cosecha de Noviembre.....	101
Figura 19.- Cantidad de almidón durante los primeros 8 días de imbibición en plántulas de <u>Ipomoea purpurea</u> .....	103
Figura 20.- Cantidad de almidón con respecto al peso fresco en frutos y semillas de <u>Ipomoea nil</u> .....	107
Figura 21.- Proporción de almidón con respecto al incremento en peso fresco en frutos y semillas de <u>Ipomoea nil</u> .....	109
Figura 22.- Comparación de los espectros de absorción del material biológico de plantas de <u>Ipomoea purpurea</u> e <u>Ipomoea nil</u> , con los espectros del galactomanano y almidón soluble para análisis de Merck.....	113

## A B R E V I A T U R A S

aA	Alfa amilasa
ADP, ATP	difosfato y trifosfato de adenosina
ADPG	adenín difosfato de glucosa
ADN	ácido desoxirribonucleíco
Alm	almidón
Almmáx	almidón máximo
b	ordenada al origen
bA	Beta amilasa
D. O.	densidad óptica
D. O. máx	densidad óptica máxima
FAA	formol-ácido acético-alcohol
G-1-P	glucosa 1 fosfato
Ln ó ln	logaritmo natural
l	longitud de onda
m	pendiente
NAD <sup>+</sup> , NADH	dinucleótido de adenín nicotidamida y su forma reducida
NADP <sup>+</sup> , NADPH	dinucleótido fosfato de adenín nicotidamida y su forma reducida
nm	nanometros
p	peso fresco
Pi	fósforo inorgánico
pmáx	peso fresco máximo
r	coeficiente de relación
r <sup>2</sup>	coeficiente de determinación
t	tiempo



UDP	uridin difosfato
UDPG	uridin difosfato de glucosa
ui	residuos

## I RESUMEN

En el género Ipomoea, es característica la presencia tanto de cotiledones como endospermo en semilla madura deshidratada. En él se incluye a Ipomoea purpurea (L.) Roth e Ipomoea nil (L.) Roth, que son especies de importancia para México por las pérdidas económicas que causan al competir como malezas con los cultivos básicos.

La capacidad de diversas malezas para sobrevivir a medios hostiles, se debe a su alto grado de especialización. La producción de una gran cantidad de semillas, la alta viabilidad de éstas y su rápida germinación, les proporcionan ventajas adaptativas que les permiten desplazar a los cultivos. Aunado a esto, la utilización de las sustancias de reserva que hagan las semillas durante el desarrollo le deben dar cierta ventaja competitiva a estos organismos, sobre el cultivo.

En este trabajo se estudió el patrón en la cantidad del almidón existente durante el desarrollo de semillas de I. purpurea e I. nil desde la antesis hasta la semilla madura hidratada y en las primeras etapas de germinación.

Los resultados muestran que el almidón se almacena en las semillas de I. purpurea e I. nil durante su desarrollo, siguiendo un patrón similar en la acumulación y disminución

del mismo, con un valor máximo del carbohidrato en el momento que la semilla presenta la mitad del peso fresco que alcanza. La cantidad de almidón es diferente para las dos especies, pero la relación almidón/peso fresco es la misma en las semillas de las dos plantas. Las diferencias que se presentan entre las cosechas de Octubre y Noviembre pueden deberse a las condiciones ambientales que influyen en la deposición de sustancias de reserva en la semilla. El almidón en I. purpurea e I. nil, es una sustancia de reserva que se almacena temporalmente en las semillas. Quedando un remanente en la semilla madura deshidratada, el cual se utiliza en las primeras fases de postimbibición en plántulas etioladas.

## II INTRODUCCION

Las arvenses, a las cuales, también se les denomina malezas o malas hierbas, son una de las plagas de mayor importancia. En la agricultura afectan a los cultivos desde su establecimiento hasta su madurez, al establecer una competencia por luz, nutrientes, agua y espacio, lo que produce bajas considerables en los rendimientos y en la calidad de los cultivos a los que invade ocasionando un aumento en el costo de producción y limpieza. Por otra parte, estas plantas dañan las obras de infraestructura como canales y carreteras y lugares de recreación. Además su presencia provoca el aumento de otras plagas como roedores e insectos, a las que sirven de hospederos (Agundis, 1984).

En nuestro país, el estudio de malezas se ha enfocado principalmente a su identificación, estructura, cuantificación de los daños que producen a los cultivos y al establecimiento de métodos de control.

Ipomoea purpurea e Ipomoea nil son malezas que ocasionan daños a los cultivos y a la infraestructura, causando pérdidas económicas importantes (Agundis, 1984; López-Curto, 1989; 1990).

Estas plantas presentan un alto grado de especialización, ya que poseen una serie de estrategias adaptativas que

les permiten sobrevivir a medios hostiles. Entre estas adaptaciones se encuentran: la producción de una gran cantidad de semillas, la alta viabilidad de éstas, una rápida germinación y establecimiento. Tales características deben estar correlacionadas con los procesos que ocurren durante el desarrollo de la semilla, así como con la utilización de las sustancias de reserva que hacen las semillas durante el mismo. Ello puede darles una ventaja competitiva a estos organismos, por lo que resulta importante hacer estudios de la movilización de las sustancias de reserva a través del desarrollo de la semilla.

### III ANTECEDENTES

#### A.- Las malezas o malas hierbas.

Las malas hierbas reciben diversos nombres y se les define de varias maneras. Se les llama malezas, malas hierbas, plantas indeseables, yuyos, arvenses, así como acahuals, jehuites o jihuites, términos que derivan del náhuatl. El término arvense, por definición abarca exclusivamente a las que viven entre los cultivos (Font Quer, 1965), en tanto que los demás términos incluyen también a plantas que se encuentran en el medio ruderal (Agundis, 1984).

Para Eaton y Mcleod (1946) las plantas arvenses son las que perjudican el crecimiento del cultivo al cual está dedicado el terreno, al competir con él por espacio, luz y nutrientes.

King (1966) señala algunas definiciones y enumera las características que se usan comúnmente para dar idea de lo que es una planta arvense, señalando que Bunting (1933) las considera como una clase especial de pioneros en la sucesión secundaria.

Las malas hierbas tienen una gran importancia desde varios puntos de vista, en la agricultura se les considera como plantas indeseables cuyo daño directo o indirecto afecta

a los cultivos desde su establecimiento hasta su madurez, ya que reducen el rendimiento de los cultivos. Carballo (1966) demuestra que en el Bajío el rendimiento del maíz se reduce desde un 25 hasta un 60%, debido a la competencia existente entre estas plantas y el cultivo.

Los daños directos son causados en primer lugar por la competencia que se establece entre el cultivo y la maleza por los factores que favorecen el crecimiento (agua, luz y nutrientes); en segundo lugar por la secreción de fitotoxinas, en tercero, por ser algunas especies parásitas, en cuarto lugar causan daños al hombre similares a los ocasionados a los animales como alergias, dermatitis o intoxicaciones. En cuanto a los daños indirectos que producen se encuentran las labores de limpia a que obligan y los problemas que causan al levantar las cosechas aumentan el costo de producción. Los productos agrícolas bajan de calidad cuando las llevan como impurezas y algunas hospedan a una amplia gama de plagas agrícolas como son roedores o diversos insectos que atacan a las plantas cultivadas. Algunas especies afectan la salud del hombre y otras son nocivas para el ganado. Todos estos factores reducen la productividad agrícola ocasionando además el aumento del costo de operación. (Agundis, 1984; López-Curto, 1987; 1990).

Por otra parte las malas hierbas también dañan directa o indirectamente, a las obras de infraestructura y lugares de recreación. Los daños directos son causados cuando invaden

dichas zonas sometiénndolas a un proceso de deterioro paulatino casi imperceptible, pero totalmente eficaz, además de obstruir las operaciones de mantenimiento. Al invadir las áreas de derecho de vía de carreteras y ferrocarriles o edificios y puentes, la maleza comienza a destruir las estructuras formando grietas y guardando tal cantidad de humedad que al poco tiempo comienza a debilitar la consistencia de los materiales. Los daños indirectos son provocados por la capacidad que tienen las malas hierbas de hospedar roedores y otros animales que destruyen las propias construcciones o ciertos materiales relacionados con dichas obras. (Agundis, 1984).

Todos estos daños, tanto a cultivos, ganado y obras de infraestructura, de una u otra manera, afectan al hombre en varios aspectos principalmente en lo económico.

Lo anterior muestra los aspectos negativos que tienen estas plantas, pero King (1966) señala su valor en la alimentación humana y de otros animales, en la medicina, como especies ornamentales, su utilidad como elementos que impiden la erosión y como tributarias de materia orgánica. Vélez (1950) coincide con King y anota usos e importancia de algunas especies de Puerto Rico. En la parte meridional de la Cuenca de México, Chenopodium album, Amaranthus hybridus, Malva parviflora, Portulaca oleracea y algunas más se consumen como alimento. Otras como Plantago major, Chenopodium graveolens, Marrubium vulgare, Malva parviflora, se usan en



la medicina popular y en general, muchos campesinos usan las especies "arvenses" como forraje de animales domésticos (Villegas, 1979).

La capacidad de diversa malezas para sobrevivir en medios hostiles se debe a su alto grado de especialización. Su ciclo de vida, morfología, fisiología y mecanismos reproductivos les proporcionan ventajas adaptativas que les permiten desplazar a los cultivos. Las plantas nocivas anuales sobreviven gracias a complicados mecanismos que en la actualidad no se conocen del todo y a nivel molecular se están dando los primeros pasos. Los mecanismos involucrados: ciclo de vida muy corto, autofecundación, producción de grandes cantidades de semillas, mecanismos de diseminación de las semillas, alta viabilidad de éstas, fenómenos de germinación, proliferación e invasión de nuevos habitats, utilizando además de las semillas, las raíces o tallos subterráneos, les permiten vivir en condiciones ambientales diferentes. (Muenscher, 1955; King, 1966).

Las malezas poseen muchas características y adaptaciones de crecimiento que las posibilita para explorar con eficacia los numerosos nichos ecológicos que han quedado desocupados, expuestos o parcialmente ocupados por las plantas de cultivo. Entre las estrategias más importantes relacionadas con las ventajas de competición, se encuentran la producción de una gran cantidad de semillas, la capacidad de germinar después de variados y largos periodos de latencia,

el rápido establecimiento y crecimiento de la plántula entre otros (Subcomité de Plantas Nocivas, 1982).

Cuando se establece competencia entre dos especies, la primera planta que ocupe el área tiene ciertas ventajas sobre las que germinen después. En cualquier producción agrícola y de control de las plantas nocivas, la función principal de la competencia entre las especies debe estar implícita. Los cultivos se escogen y mejoran en gran medida apoyándose en el crecimiento vigoroso y en un rendimiento superior, a pesar de los efectos adversos que pueden tener en los mecanismos de competencia, resistencia a parásitos o de un habitat desfavorable. De igual modo, el procedimiento de control de las arvenses se basa en una serie de modificaciones selectivas del habitat, en que se aprovecha una diferencia entre la maleza y el cultivo, asegurando una ventaja para este último. Estas modificaciones selectivas empiezan con la preparación de la tierra y se fundamentan en los diferentes requisitos para la germinación y en la respuesta de las especies cultivadas y arvenses (Subcomité de Plantas Nocivas 1982).

La rápida germinación y el pronto establecimiento de las plántulas de las arvenses, así como su crecimiento posterior se ve influido por el tamaño de los cotiledones, el índice de producción de hojas, el tamaño de las hojas primarias, los cuales son factores importantes para el rápido establecimiento de la superficie fotosintética y para la producción de sombra sobre los organismos que no se encuen-

tran bien establecidos (Subcomité de Plantas Nocivas, 1982).

Las arvenses más estudiadas son aquellas que infestan principalmente los cultivos de la alimentación básica para el hombre, como son aquellas que se encuentran en los cultivos de trigo, sorgo, cebada, avena, maíz, frijol y arroz entre otros.

En México el maíz y frijol ocupan el primero y el segundo lugar de producción anual de alimentos, siendo la base de la dieta del mexicano (Hernández, 1982). El cultivo de maíz en México es infestado por más de 390 especies de malas hierbas pertenecientes a 52 familias, y el cultivo de frijol por 261 especies pertenecientes a 34 familias. La intensidad de los daños que las malas hierbas ocasionan a estos cultivos dependen en gran cantidad de factores, como son: el tiempo en que se mantiene la competencia entre el cultivo y la arvense, el tipo de especies infestantes, las densidades de población, la época de emergencia de las malas hierbas en relación con la de los cultivos, los sistemas de siembra prevalecientes, entre otros (Agundis, 1984).

La libre competencia entre la maleza y los cultivos de maíz, durante los primeros 30 días de su desarrollo, ocasiona que las plantas del cultivo sean cloróticas, de poco vigor y altura. Esto genera reducciones en los rendimientos, los cuales alcanzan una pérdida de un 24 por ciento. Las pérdidas se incrementan severamente, cuando los periodos de

competencia se prolongan más. Así mismo, este fenómeno se presenta cuando la maleza emerge antes que el maíz, o bien cuando se presentan grandes poblaciones de especies de alta capacidad competitiva (Agundis 1984).

Por otra parte, en los cultivos de frijol, cuando las malas hierbas no se controlan durante los primeros 30 días de su desarrollo, las reducciones en los rendimientos del cultivo del frijol alcanzan en promedio un 33 por ciento como consecuencia de los daños ocasionados por la competencia. Esto sucede, generalmente, en las siembras realizadas bajo sistemas de temporal o riego durante el ciclo primavera-verano (Agundis, 1984).

Dentro de la familia de las convolvuláceas, el género Ipomoea sobresale por su gran diversidad morfológica y por las adaptaciones de sus especies a gran variedad de climas con muy diferentes condiciones ecológicas. El total de sus especies se estima en cerca de 500 especies ampliamente distribuidas en el mundo. En México existen cerca de 150 especies. (Austin y Pedraza, 1983)

El género Ipomoea tiene importancia económica por sus usos alimenticios: camote (Ipomoea batatas) (IBPGR, 1981), medicinales: (Ipomoea pes-caprae, Ipomoea purga, Ipomoea stans entre otras) (Martínez, 1969; Pongprayoon, 1991) y ornamentales (Ipomoea purpurea) (Verdcourt, 1970). Algunas especies tienen interés etnobotánico por su empleo ritual o

mágico religioso en varias culturas indígenas (Ipomoea purpurea) (Schultes, 1981).

Las especies que se encuentran dentro del género Ipomoea se caracterizan por ser plantas herbáceas o leñosas, trepadoras, arbustos o árboles, frecuentemente hierbas volubles, a veces erectas o postradas o flotantes, a veces con tubérculos pequeños o muy voluminosos. Hojas enteras, lobuladas, divididas o compuestas. Inflorescencias cimosas o cimoso-compuesta, o bien, flores solitarias; sépalos de forma y tamaño variable; corola púrpura, roja, naranja, rosada, blanca o amarilla, infundibuliforme a campanulada, tubular a salveriforme, rara vez urceolada, uniones de los pétalos glabros o pubescentes, un estilo, estigma incluído o exserto globoso, muchas veces bi o trilobulado; estambres alternipétalos, anteras oblongas, con polen siempre espinuloso, esférico con numerosos poros. Fruto capsular usualmente tetravalvado, con cuatro o seis semillas; las cuales tienen dos caras planas la dorsal convexa, glabras a tomentosas, a veces lanosas. (Matuda, 1963; Austin y Pedroza, 1983)

Ipomoea purpurea (L.) Roth. conocida comunmente como "campanita" o "manto" es una especie que infesta los cultivos de maíz y de frijol ocupando un lugar importante en el deterioro de la producción de estos cultivos, el séptimo en el caso del maíz y el segundo en el del frijol (Agundis, 1984). Ipomoea purpurea es una enredadera anual, ramificada, que se desarrolla sobre los cultivos. Tallos y ramitas

pubescentes a tomentosas, o hirsutos. Peciolos de 4 a 20 cm. Hojas ovadas, enteras de 3 a 17 cm de largo por 2 a 15 de ancho, base cordada con aurículas redondas, ápice agudo a acuminado, densamente pubescentes en ambas caras. Pendúnculos de 0.2 a 15 cm, tomentoso-pubescentes. De 2 a 5 flores en cimas, a veces solitarias. Brácteas y bracteolas lineares lanceoladas, pubescentes. Pedicelos de 12 mm de largo pubescentes. Sépalos casi iguales lanceolados o angostamente elípticos de 8 a 15 mm de largo por 2.5 a 4.5 de ancho, acuminados, peludos, de base engrosada. Corola infundibuliforme, azul o rosada con el rubo más claro, de 2.5 a 5 cm de largo, glabra. Ovario ovoide, glabro, trilobular, sextiovular. El estilo es filiforme conteniendo un estigma granuliento y más o menos bifido. Cápsula subglobosa, de 1 cm de grueso, glabra; semillas negras de 5 mm de largo densamente tomentosas. Ipomoea purpurea es una planta de hábitos trepadores, que se enrolla sobre los cultivos. (Matuda, 1964, 1966) Produce una gran cantidad de semillas con alto porcentaje de germinación principalmente en los meses de Abril y Mayo. La floración se inicia en Agosto, encontrándose un número considerable de frutos en Septiembre y Octubre, disminuyendo drásticamente en Noviembre y Diciembre. (Conzatti y Smith, 1981)

Ipomoea nil (L.) Roth. es una planta herbácea, anual o semiperenne, con tallos volubles o decumbentes, de 2 a 5 m de largo, cilíndricos o angulosos de 1 a 4 mm de grueso, con pelos hirsutos, retrorsos y cortos. Peciolos de 1 a 17 cm,

con los pelos retrorsos, hirsutos. Láminas de 3 a 18 cm de largo por 3 a 19 de ancho, de contorno anchamente ovado, enteras o trilobadas, pocas veces pentalobadas; lóbulos laterales oblicuo-ovados o anchamente falcados, acuminados; base anchamente cordada con seno abierto, de profundidad variable; ambas caras densamente pubescentes. Inflorescencias cimosas de 2 a 7 flores a veces solitarias; pedúnculos gruesos, densamente pubescentes de 3 a 8 cm de largo; pedicelos de 1 a 3 cm de largo; brácteas lanceoladas, de 5 a 11 mm de largo, perennes; bracteoladas filiformes, de 3 a 6 mm. Sépalos subiguales; los exteriores linear-lanceolados, de 3.5 a 4 mm de largo con pelos amarillentos, de base ensanchada, los interiores lanceolados, de 2.5 a 3 mm de ancho en la base, con pocos pelos. Corola infundibuliforme de 2.5 a 6 cm de largo, exteriormente glabra, azul-pálido, volviéndose rojiza. Ovario ovoides, glabro, trilocular. Cápsulas ovoides o suglobositas de 9 a 12 mm de diámetro; semillas de 4.5 a 6 mm de largo, negras con pubescencia parduzca. Conocida vulgarmente como "tumba vaquero". (Matuda, 1964)

#### B.-Desarrollo de las semillas de Angiospermas.

La semilla es la parte del fruto que contiene el germen, es el óvulo fecundado y maduro; generalmente contiene sustancias de reserva que consume durante la germinación y el desarrollo inicial. Su tamaño varía desde apenas visibles a simple vista, como muchas orquideas, hasta alcanzar varios kilogramos de peso, como los cocos.

La semilla se desarrolla a partir de un óvulo fecundado y en la madurez, está constituida por las siguientes partes: el esporófito joven y parcialmente desarrollado llamado embrión, una cantidad variable de endospermo y la capa protectora o cubierta de la semilla, que deriva del tegumento o tegumentos. (Esau, 1977).

Algunas características externas de las semillas pueden distinguirse por ciertos detalles estructurales reminiscentes del óvulo. El micrópilo, que es una pequeña abertura alargada del óvulo que se forma por la fusión incompleta del o los tegumentos, puede quedar completamente obliterado, o en forma de poro ocluido. El hilo es la cicatriz que marca el lugar en donde se adhiere el funículo a la placenta. En óvulos anátropos el funículo a menudo forma una arruga, el rafe, a lo largo de un borde que parte del hilo. En algunas semillas se encuentra una protuberancia carnosa cerca del hilo, llamada carúncula y un arilo, que es una envoltura, la cual generalmente se origina en la base del óvulo.

El óvulo es el megasporangio rodeado de sus cubiertas protectoras y contiene el gametofito femenino o saco embrionario, que está formado por ocho núcleos. Los núcleos se distribuyen en siete células, de las cuales tres forman el aparato del huevo (la ovocélula y dos sinérgidas) y se localiza en el extremo micropilar. En el extremo chalazal se encuentran tres células antípodas y al centro la célula central que presenta dos núcleos (Esau, 1977).



El estímulo que señala el inicio de una serie de eventos que culminan con la formación de la semilla es la doble fecundación.

La doble fecundación, única en angiospermas, consiste en una singamia, unión de los núcleos de la célula espermática con la ovocélula, la cual se da por corrientes citoplásmicas y hay fusión de membranas. Uno de los núcleos de la célula espermática del grano de polen, se fusiona con la ovocélula, dando origen al cigoto y posteriormente al embrión. El segundo núcleo espermático se fusiona con los dos núcleos polares de la célula central (triple fusión) y se desarrolla el endospermo. Los tegumentos del óvulo darán origen a la cubierta seminal (Jensen, 1973).

El embrión presenta variadas características de desarrollo y alcanza distintos tamaños y grados de diferenciación en las angiospermas.

El desarrollo del embrión en Angiospermas sigue un modelo ordenado característico de un grupo dado de plantas ya desde el comienzo. La diferenciación en dos polos (hipocótilo y epicótilo) indican un establecimiento temprano de la polaridad (Wardlaw, 1955), y la diferencia entre los dos polos aumenta a través de las distintas divisiones y engrosamientos celulares en las fases sucesivas de la embriogénesis (Meyer, 1958). El embrión ilustra el comienzo de la organización característica de la planta adulta y es usado para los

estudios de las relaciones casuales en el crecimiento organizado. El embrión está formado por un cuerpo, el cuerpo hipocótilo-epicótilo, que lleva, en un extremo, el meristemo radical y, en el otro, el cotiledón o cotiledones y el meristemo del primer brote. Usualmente en gramíneas se desarrolla una caliptra sobre el extremo de la raíz embrionaria. (Esau, 1977). La estructura del embrión maduro y su posición en la semilla además de su relación con el endospermo son distintas en los diferentes grupos de plantas, por lo que pueden servir para identificar las semillas (Martin, 1946). Las características del embrión maduro desempeñan un papel importante en la clasificación de las gramíneas. (Reeder, 1957).

El tejido de reserva o endospermo, se desarrolla normalmente después de la fecundación a partir del producto de la triple fusión de los dos núcleos polares con un gameto masculino (Brink y Cooper, 1947). La primera célula que entra en actividad en el saco embrionario después de la fecundación es la célula central. El núcleo de fusión se llama normalmente núcleo del endospermo primario. De acuerdo a su desarrollo inicial se reconocen tres tipos de endospermo: (1) nuclear, donde se da la cariocinesis sin citocinesis, formándose muchos núcleos por divisiones nucleares libres, que pueden ser seguidas o no por la formación de membranas celulares, lo presentan la mayoría de las angiospermas; (2) celular se forman membranas celulares inmediatamente después de la primera división nuclear; (3) helobial después de la primera mitosis el saco embrionario se divide en dos cámaras

desiguales, de las que la mayor (calazal) normalmente desarrolla endospermo no celular y la menor (micropilar) queda como una gran célula, siendo este el endospermo característico de las monocotiledóneas. En algunos taxa el tejido de reserva se deriva de la nucela, que es el tejido central en donde se encuentran las células esporógenas y de la cual una parte puede ser retenida en la semilla para acumular sustancias de reserva y se le denomina perispermo. Así, el almacenamiento en las semillas de las angiospermas puede presentarse en tejidos triploides (endospermo) y diploides (perispermo) (Esau, 1977). La estructura del endospermo completamente desarrollado varía considerablemente. Puede estar constituido por un tejido muy vacuolizado y de membranas delgadas sin sustancia de reserva. Dicho endospermo es utilizado, parcial o completamente, por el embrión en desarrollo. En muchas plantas el endospermo se diferencia como tejido de reserva; como tal, puede tener paredes delgadas o gruesas o a veces muy gruesas y de aspecto corneo. (Robbins y Bothwick, 1925). En general, el endospermo está constituido por restos de paredes celulares, las cuales carecen de membranas y tiene una consistencia blanda y oleosa (Müller, 1943; Dore, 1956; Esau, 1977), y en su parte más externa por una capa de células vivas, que recibe el nombre de capa de aleurona, la cual puede tener uno o más estratos. Con frecuencia el endospermo invade a los tegumentos en forma de haustorios. En el endospermo hay diversas sustancias almacenadas (Crocker y Barton, 1953; Miller, 1958). El principal polisacárido almacenado es el almidón en forma de granos de

almidón (Preiss y Levi, 1980). Los cuales se combinan en diversas proporciones con proteínas y lípidos (Robértis, 1986). En algunas semillas existen otros polisacáridos que, por hidrólisis, dan manosa y otros monosacáridos (Meier, 1958), los cuales constituyen, como componentes de la pared celular, las reservas de carbohidratos.

En la semilla madura las funciones del endospermo son: la producción de enzimas (amilasa) para degradar al almidón, nutrir al embrión, absorber grandes cantidades de agua, formar un ambiente húmedo alrededor del embrión y romper la testa (Esau, 1977).

Una vez formado el endospermo su destino dependerá del desarrollo del embrión. Por ejemplo, en las especies de leguminosas como chícharo, frijol, haba y cacahuate, el endospermo se consume totalmente en las semillas maduras teniendo como estructura de reserva únicamente a los cotiledones. En los cereales como el trigo, avena, maíz y arroz, se conserva una proporción considerable de endospermo en la semilla madura. También encontramos semillas que en la madurez contienen como estructura de reserva a los cotiledones y poseen, además, un endospermo que puede o no estar en forma residual, siendo ejemplo de éstas el trébol y la alholva (Díaz-Fontones et al, 1991).

La cubierta de la semilla se desarrolla a partir del tegumento o tegumentos. Durante el desarrollo de la cubierta

seminal este puede ser muy diferente entre las distintas especies. Existen variaciones en la intensidad de la destrucción celular, en el grado de esclerificación y distribución de las células, en la disposición de sustancias y en la diferenciación de tricomas especializados, tales como pelos, papilas y ganchos, lo que va a depender del número de tegumentos de los que este provisto el óvulo. La cubierta de la semilla está constituida por células más o menos vacuoladas de membranas delgadas. Durante la maduración de la semilla la testa experimenta en grado variable alteraciones estructurales. Puede darse una variación en el contenido y estructura de la membrana, así como la destrucción de alguna o de todas las capas tegumentarias iniciales. Las diferencias entre las distintas plantas en cuanto a la cubierta de la semilla, pueden ser inferidas de diferencias en la estructura del óvulo, tales como el número y el espesor de los tegumentos y disposición de los tejidos vasculares. (Esau, 1977). Por ejemplo *Ipomoea purpurea* que presenta un óvulo anátropo y unitégmico, tiene un tegumento constituido por la protodermis, la hipodermis (uniestratificadas) y una capa de parénquima, interna pluriestratificada de 18-21 estratos, cuyas células contienen una gran cantidad de almidón; a través del desarrollo la protodermis se divide en plano periclinal formando dos estratos, de los cuales el externo se divide anticlinalmente formando la subepidermis y el estrato interno que se divide periclinalmente de una a dos veces para formar el esclerénquima en empalizada constituido por 2 ó 3 estratos celulares; el parénquima se consume conforme va

creciendo el embrión, quedando en la madurez, como una capa fibrosa formada por restos de paredes celulares (Ponce-Salazar et al, 1990).

#### C.-Carbohidratos de reserva en semillas.

La mayoría de las semillas poseen como sustancias de reserva a dos polisacáridos de gran importancia: el almidón o el galactomanano; el primero se almacena en el endospermo de las gramíneas y en los cotiledones de las dicotiledóneas no endospermicas. Por otro lado al galactomanano lo encontramos almacenado en el endospermo de semillas maduras de las dicotiledóneas endospermicas como la lechuga y el trebol (Díaz-Pontones et al, 1991).

Todos los animales y la mayoría de microorganismos dependen de la ingestión de grandes cantidades de compuestos orgánicos procedentes de su entorno. Estos compuestos proporcionan el esqueleto de carbón para la biosíntesis y a través de su oxidación controlada, la energía metabólica que impulsa a todos los procesos celulares.

Existen varios tipos de polisacáridos de reserva en las plantas, siendo el almidón el más importante y el más abundante. En las plantas superiores es su principal fuente de almacenamiento de energía. Se deposita en grandes gránulos en los cloroplastos de algunas células verdes o en los amiloplastos incoloros de la raíz, tallo y otros tejidos

vegetales (Akazawa, 1976).

Las células vegetales contienen diversos organelos denominados generalmente plastidios. Algunos de ellos, como los leucoplastos, son incoloros y participan principalmente en el almacenamiento y metabolismo del almidón. Cuando están especializadas en estas dos funciones se denominan amiloplastos. Los leucoplastos no constituyen un grupo de plastidios bien definidos. Se encuentran en células embrionarias, germinales, meristemáticas y en las regiones de la planta que no reciben luz. Los leucoplastos comúnmente se agregan cerca del núcleo. Se ha observado que los leucoplastos se caracterizan por la falta de tilacoides y ribosomas. Otros plástidos contienen diversos pigmentos y en conjunto se denominan cromoplastos. Entre éstos los más importantes son los cloroplastos, que contienen el pigmento verde, clorofila. El cloroplasto posee una doble membrana externa, un estroma lleno de enzimas solubles, y un sistema complejo de compartimientos rodeados por membranas. Contienen además un tipo de sistema genético semiautónomo con su propio ADN. Poseen asimismo ribosomas y pueden sintetizar algunas de sus propias proteínas. Los cloroplastos son el sitio de la fotosíntesis, proceso por medio del cual un vegetal puede captar la energía de la luz y utilizando  $H_2O$  y  $CO_2$ , sintetizar diversos compuestos que almacena y utiliza eventualmente como nutrientes. Los cloroplastos se localizan principalmente en las hojas en las plantas superiores (Esau, 1977; Robertis, 1986)

La fotosíntesis es una de las funciones biológicas fundamentales. Por medio de la clorofila contenida en los cloroplastos, los vegetales verdes son capaces de absorber la energía que la luz solar emite como fotones y transformarla en energía química. Esta se acumula en las uniones químicas de moléculas que se sintetizan y son el principio de sustancias alimenticias.

La fotosíntesis comprende una serie compleja de reacciones (que sale fuera de los intereses de la presente tesis), las cuales en las plantas verdes transcurren en dos fases: las reacciones luminosas, que ocurren solamente cuando las plantas están iluminadas, y las reacciones oscuras, que pueden suceder en ausencia o en presencia de la luz. En las reacciones luminosas, la clorofila y otros pigmentos de las células fotosintéticas absorben energía luminosa y la conservan en forma química sintetizando dos productos ricos en energía, el ATP y el NADPH; simultáneamente, se desprende oxígeno. En las reacciones oscuras el ATP y el NADPH que se han producido en las reacciones en presencia de la luz, se emplean para reducir al dióxido de carbono y formar glucosa y otros productos orgánicos como sacarosa (Lehninger, 1984).

El gliceraldehído 3-fosfato que se produce en los cloroplastos a través del ciclo de fijación del carbono, se utiliza como intermediario central en la glucólisis. Además algunas moléculas del mismo se transforman en ácidos grasos, aminoácidos y almidón a través de unas reacciones biosinté-

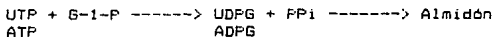


ticas importantes que tienen lugar en el estroma de los cloroplastos (Rees, 1980).

Por otra parte, la glucosa 6 fosfato que se produce durante la fotosíntesis, es el precursor de carbohidratos que pueden acumularse como granos de almidón o de otros polisacáridos dentro del cloroplasto o, más frecuentemente, en el interior de los leucoplastos (amiloplastos). Después de varias etapas que involucran la participación de diferentes plastidios y de sistemas enzimáticos, el material fotosintetizado se almacena como producto de reserva o bien se emplea como parte estructural del vegetal (por ejemplo, celulosa).

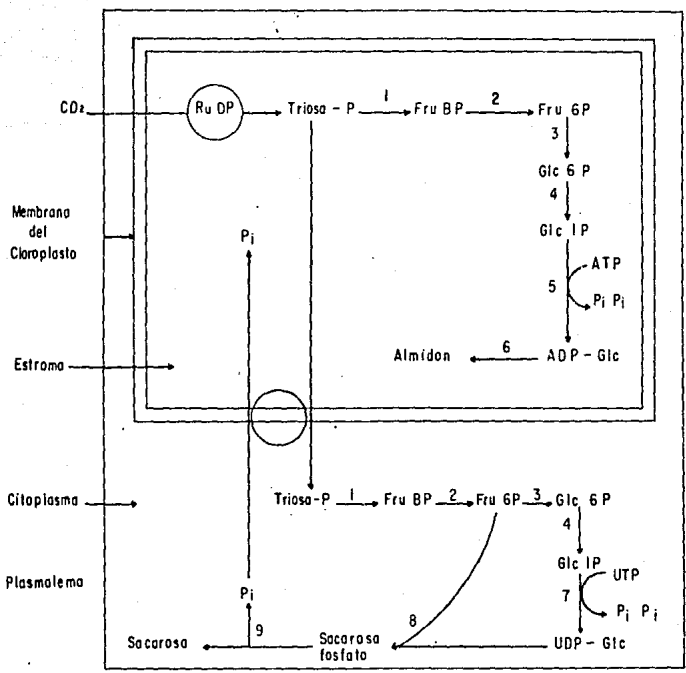
La síntesis del almidón se lleva a cabo por la transglucosilasa del uridín difosfato de glucosa (UDPG) o el adenín difosfato de glucosa (ADPG). Esta reacción sólo forma enlaces  $\alpha$  1-4 (Preiss, 1980). La reacción es estimulada alostéricamente por el producto primario de la fotosíntesis, el ácido fosfoglicérico, dando un efectivo control por retroacción que asegura la rápida formación de almidón a la luz (Fig. 1).

La síntesis de UDPG o ADPG se efectúa por la reacción:



La glucosa 1 fosfato (G-1-P) puede derivarse de la fructosa 6 fosfato que se produce en la fotosíntesis o de la sacarosa (Preiss, 1980) (Fig. 1).

Figura 1.- Rutas de la síntesis de almidón y sacarosa en las células fotosintéticas. Las enzimas se numeran como sigue: 1. fructosa 1-6 difosfato aldosa, 2. fructuosa 1-6 difosfatasa, 3. glucofosfato isomerasa, 4. fosfoglucomutasa, 5. ADP-glucofosforilasa, 6. ADP-glucosa-almidón glucosil-transferasa, 7. UDP-glucofosforilasa, 8. sacarosa fosfato sintetasa, 9. sacarosa fosfato fosfatasa. Tomada de Rees (1980).



La enzima que sintetiza al almidón requiere un aceptor primario de por lo menos dos glucosas residuales.

La síntesis de los enlaces  $\alpha$  1-6 que forman las ramificaciones de la amilopectina, está catalizada por una enzima llamada enzima ramificadora o enzima Q, la cual transfiere cadenas de glucosas con enlaces  $\alpha$  1-4 a la posición 6 en otra cadena, para formar la ramificación (Preiss y Levi, 1980).

El almidón que se produce durante la fotosíntesis y que se acumula en el cloroplasto es denominado almidón de asimilación, siendo ésta una forma transitoria de reserva. (Preiss y Levi, 1980)

La sacarosa en las plantas, es la principal forma de transporte de azúcares entre las células vegetales. Se importa desde las hojas, a través de los haces vasculares para suministrar los carbohidratos que necesita el resto de la planta. El almidón de asimilación, se transforma en sacarosa para su posterior transporte a toda la planta. Por otra parte, durante la germinación de las semillas o de los granos de cereales que contienen almidón como sustancia de reserva, este compuesto se degrada enzimáticamente a carbohidratos de bajo peso molecular para ser metabolizados en un futuro (Preiss 1982).

Los gránulos de almidón son estructuras semicristalinas constituidas por polímeros de glucosa; encontrándose dentro

del gránulo dos polisacáridos: la amilosa que es esencialmente lineal y la amilopectina que es ramificada. Además encontramos asociados al gránulo de almidón lípidos y proteínas. El tamaño y la forma de los gránulos de almidón difieren entre sí, dependiendo de la especie de origen, variando en forma, pero generalmente van de elípticos a ovales, con un promedio de diámetro entre las 19 y las 28 micra y de 22 a 39 micra de largo (Hoover, 1985). Los gránulos de almidón abundan especialmente en tubérculos, tales como la papa (Greenwood y Thomson, 1962), en semillas (cereales y leguminosas) (Landry y Smith, 1988; Takahashi y Seib, 1988), en raíces (tapioca y camote) (Eliasson 1988), pero la capacidad de sintetizar almidón la poseen las células de muchas plantas. Estos gránulos de almidón pueden ser vistos con el microscopio óptico e identificados de diversas maneras, entre ellas la simple tinción con una solución de yodo. (Robertis, 1986)

En los vegetales, el almidón se deposita como partícula granular en cada grano de almidón, que se diferencia de otros dependiendo de la especie de la que provenga, por el tamaño, la posición del hilo, la forma, la estructura entre otras características, lo que facilita su identificación (French, 1984).

La cantidad y proporción de amilosa/amilopectina de los gránulos de almidón varía dependiendo de la especie, siendo bien conocido que la cantidad de amilosa y amilopectina que

existe en el almidón de plantas está determinado genéticamente. (Akazawa, 1976).

Estos polisacaridos pueden ser separados de acuerdo a su solubilidad en el agua, a 70 °C, la fracción soluble es la amilosa en tanto que la insoluble es la amilopectina. (Banks y Muir, 1980). Usando este método de separación se ha podido establecer la proporción entre los dos componentes del gránulo de almidón; estimándose que la mayor proporción de 70 a 90% corresponde a la amilopectina y el resto de 10 a 30% a la amilosa. Se ha observado que al elevar la temperatura de 70 a 98 °C, durante la separación por este método el contenido de amilosa se incrementa (Frey-Wyssling y Muhlethaler, 1965); lo que hace necesario buscar métodos alternativos que produzcan una separación específica de los componentes del almidón y que faciliten su determinación cualitativa, para lo que se han utilizado diversos protocolos de separación basados en el principio de precipitación de las moléculas y para los cuales se han usado etanol, alcohol amílico y propanol, que fueron propuestos desde las décadas de los cuarenta a cincuentas y que se han modificado para seguir utilizándolos en la actualidad (Schoch, 1945).

La amilosa y la amilopectina se pueden distinguir entre sí por sus propiedades físicas y químicas: la amilosa es un conjunto de moléculas de glucosa lineal unidas por enlaces  $\alpha(1-4)$ , con una conformación helicoidal. Su peso molecular varía entre 10,000 a 100,000 daltons. En estudios por

difracción de rayos X se observó que su estructura es cristalina, es completamente hidrolizable en presencia de la amilasa y otras enzimas, su naturaleza lineal le confiere una amplia habilidad para formar complejos con yodo y sustancias polares (alcoholes y ácidos grasos de bajos pesos moleculares), contiene entre 250 y 300 unidades de glucosa. Dependiendo de varios factores como la concentración, el grado de polimerización y la temperatura, la amilosa puede recristalizarse, fenómeno conocido como retrogradación (Banks y Muir, 1980).

La amilopectina es una cadena de moléculas de glucosa que presenta ramificaciones ocasionales a lo largo de una extensión de alrededor de 1000 residuos de glucosa; en su parte lineal las moléculas de glucosa están unidas por enlaces  $\alpha(1-4)$ , las ramificaciones formadas por una serie de residuos de glucosa, generalmente de 20 a 25, están unidas al resto de la molécula por enlaces  $\alpha(1-6)$ , lo que hace de la amilopectina un polisacárido altamente ramificado, cuyo peso molecular está por arriba del millón de daltons. Estudios por difracción de rayos X han mostrado que su estructura es amorfa; en presencia de la amilasa y otras enzimas la hidrólisis es parcial, dando fragmentos de dextrina de alto peso molecular; la formación de complejos es muy limitada; siendo la amilopectina muy estable en solución acuosa. (Banks y Muir, 1980).

Los gránulos de almidón son birefringentes a la luz polarizada, lo que nos sirve como índice para dilucidar el

grado de orden dentro del gránulo. (Eliasson, 1988).

Estudios cristalográficos y de rayos X han sido utilizados para poder definir la estructura fina de los cristales que forman al gránulo de almidón.

La estructura de la molécula de amilosa fue propuesta por Rundle et al (1944), se observó que era una estructura helicoidal en la que se encuentran involucrados seis residuos de glucosa por giro, que al formar el complejo amilosa-yodo, rodean a la molécula de yodo la cual se encuentra localizada en el centro de la helice, dando como consecuencia un color azul. Teitelbaum et al (1978) usando una combinación de resonancia demostró que el yodo que se encuentra en el centro de la helice de la amilosa, está presente en la forma de ion  $I_3^-$ . Por otra parte la amilopectina es una molécula elongada que se extiende desde el centro del gránulo hasta la periferia, compuesta de racimos de ramificaciones. Estas forman una doble helice, que es la que da la estructura cristalina de la amilopectina, la cual se ve interrumpida por regiones amorfas, constituidas por las partes lineales de la amilopectina; cuando se forma el complejo amilopectina-yodo en el que se observa una coloración violacea, se ha demostrado que solo las ramificaciones de la cadena intervienen en la formación del complejo (Banks y Muir, 1980; Eliasson, 1988).

Las moléculas de amilosa y amilopectina se encuentran organizadas en el gránulo de almidón para dar una estructura



cristalina en forma de dominio. Cuando se analiza el almidón por difracción de rayos X se obtienen patrones de difracción característicos. El patrón de difracción A que es típico de los almidones de los cereales, en donde las ramificaciones de la amilopectina que forman la doble helice se empaquetan en una unidad ortorrómbica; el patron B que es el que presentan los almidones de los tubérculos, en donde la doble helice de las regiones cristalinas de la amilopectina se empaquetan en forma hexagonal y el patrón de difracción C, que es el de los almidones de las leguminosas, en el cual la unidad de empaquetamiento de las dobles helices de la amilopectina, es una combinación de los patrones A y B. El largo de la cadena de amilopectina (en unidades de glucosa) es de 26 para el almidón de tipo A, de 36 unidades de glucosa para el de tipo B y de 28 unidades para el almidón de tipo C (French, 1984; Eliasson, 1988)

Se sabe que existe una síntesis vigorosa del almidón desde la antesis hasta la maduración de los granos de cereales y semillas de leguminosas. Durante la germinación las reservas existentes como almidón son degradadas enzimáticamente a carbohidratos de bajo peso molecular para ser utilizadas en un futuro. Esta degradación comprende tres etapas: (1) degradación del gránulo de almidón a una maltodextrina soluble, (2) degradación de la maltodextrina a glucosa o glucosa 1-fosfato, y (3) metabolismo de la glucosa y/o su exportación. (Preiss y Levi, 1980)

Se conocen dos vías catabólicas del almidón: una involucra a las amilasas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y la otra a la fosforilasa. (Preiss y Levi, 1980)

Una de las vías catabólicas del almidón es la degradación amilolítica. Esta vía involucra la intervención de varias enzimas para dar glucosa, entre las más importantes se encuentra la  $\alpha$  amilasa (aA) y la  $\beta$  amilasa (bA). La hidrólisis de la amilosa por la aA es bifásica, pues inicialmente la enzima somete al gránulo de almidón a una fragmentación rápida, dando como producto varias cadenas de maltodextrina (Greenwood et al, 1965). Posteriormente la aA prosigue la hidrólisis de la maltodextrina dando como productos finales principalmente glucosa, maltosa, maltotriosas y maltodextrinas de bajo peso molecular. Por su parte la hidrólisis de la amilopectina por medio de la aA da la producción de grandes maltodextrinas, pero una hidrólisis prolongada de este carbohidrato da como productos, polisacáridos de bajo peso molecular y dextrinas ramificadas, debido a que esta enzima es incapaz de hidrolizar los enlaces  $\alpha$  (1-6) que forman las ramificaciones de la amilopectina (Thoma et al, 1971; Manners, 1974).

Por otro lado la bA es una exoenzima que atacó las terminales no reducidas del almidón, dando como productos la  $\beta$  maltosa y la  $\beta$  dextrina límite (Thoma et al, 1971). Esta enzima se encuentra sólo en los vegetales y ha sido registrada en granos no germinados de trigo y de soya (Gertler y

Birk, 1965; Tipples y Tkachuk, 1965), durante la germinación de cebada, sorgo y trigo entre otras (Daussant y Corvazier, 1970; Okamoto y Akazawa, 1979; Enari y Sopanen, 1986; Sopanen y Lauriere, 1989), en hojas de haba y espinaca (Chapman et al, 1972; Okita et al, 1979), en raíces de alfalfa y camote (Balls et al, 1948) o durante la germinación de semillas de chicharo (Swain y Dekker, 1966).

La bA es una enzima que únicamente puede hidrolizar los enlaces  $\alpha$  (1-4) y que de igual forma que la aA, no puede degradar las ramificaciones de la amilopectina. La degradación de la amilosa por la bA da como resultado la producción de  $\beta$  maltosa, mientras que la amilopectina por acción de esta enzima se convierte en  $\beta$  maltosa y una  $\beta$  dextrina límite (Bewley, 1978).

Una vez que se ha formado la dextrina límite por parte de la aA o de la bA, ésta debe ser desramificada por medio de las enzimas desramificadoras que atacan los enlaces  $\alpha$  (1-6).

A partir del año de 1940, en que se descubrió la fosforilasa del almidón, se le ha asignado una función principal en la degradación del almidón como vía alterna, aunque se ha propuesto que juega un papel en la síntesis de este polisacárido en algunas plantas. (Preiss y Levi, 1980; Suda et al, 1986). La fosforilasa del almidón se encuentra dentro del grupo de enzimas capaces de hidrolizar al almidón, la cual incorpora un grupo fósforo a la ruptura del enlace  $\alpha$  1-4

entre el último y penúltimo residuo de glucosa en el extremo no reducido de la cadena del polisacárido. Esto da como resultado la formación de glucosa 1 fosfato, que se libera del carbohidrato en cuestión, mientras que éste último queda al final con un residuo menos de glucosa. Esta enzima ataca repentinamente a la amilosa y a la amilopectina degradando a ésta última hasta dos o tres residuos de glucosa antes de la ramificación en la que se encuentra el enlace  $\alpha$  1-6 (Bewley, 1978; Preiss y Levi, 1980).

#### IV O B J E T I V O S

Este proyecto de tesis forma parte de la línea de investigación:

Movilización de sustancias de reserva durante el desarrollo, germinación y establecimiento de la plántula de malezas.

##### Objetivo General:

El objetivo general fue el determinar el cambio en la cantidad de almidón durante el desarrollo de semillas de dos especies: Ipomoea purpurea (L.) Roth e Ipomoea nil (L.) Roth, desde la antesis hasta semilla madura hidratada y durante las primeras fases de germinación.

##### Objetivos Particulares:

1.-Establecer una técnica de extracción y cuantificación del almidón para semillas en desarrollo.

2.-Proponer un modelo matemático en que se relacione el cambio en peso conforme transcurre el tiempo de desarrollo.

3.-Determinar el cambio en la cantidad de almidón durante el desarrollo de semillas y las primeras fases de

germinación de I. purpurea, usando como parámetros de desarrollo el tiempo y el incremento en peso fresco.

4.-Determinar el cambio en la cantidad de almidón en semillas de I. nil en diferentes etapas de desarrollo, utilizando el incremento en peso como un parámetro de la etapa de desarrollo de la semilla.

## V JUSTIFICACION

Es importante el estudio de las malas hierbas, a través de aquellas adaptaciones que les permiten explorar y sobrevivir con eficacia a diferentes medios, lo cual se debe a su alto grado de especialización. Entre las adaptaciones que tienen las arvenses se encuentran la producción de una gran cantidad de semillas, la alta viabilidad de éstas, la rápida germinación, el rápido establecimiento y crecimiento de la plántula. Estas características se deben al tamaño de los cotiledones y al índice de producción de hojas. El desarrollo de éstas estructuras en semillas maduras se encuentra influido directamente por los pasos que sigue durante las fases del desarrollo. Estas capacidades adaptativas preparan a las semillas para competir ventajosamente con los cultivos, a los cuales pueden desplazar, causando graves daños en su productividad, aumentando el costo de mano de obra por mantenimiento y por ende los rendimientos decrecen. Por otra parte la presencia de semillas de arvenses en los granos de cereales, disminuye su valor comercial e incluso impide su exportación.

Ipomoea purpurea e Ipomoea nil son especies de importancia para México, por la problemática que presentan, principalmente por las pérdidas económicas que causan (Agundis, 1984; López-Curto, 1989; 1990). Es poco lo que se conoce de estas especies, la mayoría de los trabajos se han

enfocado hacia su estructura, ecofisiología y los probables mecanismos de control. Por otra parte, los mecanismos adaptativos que favorecen su competitividad no se conocen a profundidad, por lo que estudios a nivel bioquímico pueden darnos algún indicio sobre esta problemática. Dado que la utilización que hagan las semillas de las sustancias de reserva durante su desarrollo, está relacionada de alguna forma con las adaptaciones de estas semillas como malezas, y considerando que el almidón es un carbohidrato de reserva importante en esta etapa, se hace necesario conocer el cambio en la cantidad de almidón a través del desarrollo, de lo cual poco se conoce. Este proyecto de investigación, se caracteriza por ser un de los primeros al respecto, en semillas en desarrollo y pretende conocer las posibles implicaciones adaptativas que puedan significar.

Los datos que se aportan, incrementan el conocimiento de las malas hierbas, proporcionando mayores posibilidades de controlarlas.



## VI MATERIALES Y METODOS

A.- Siembra de semillas y obtención del material biológico.

### 1.-Colecta e incremento del material biológico.

Las semillas de Ipomoea purpurea se recolectaron en cultivos de maíz y frijol del Estado de Morelos en el año de 1984; a partir de esta colecta se germinaron y sembraron periódicamente para incrementar el banco de semillas. Para ello se tomó una parte de las semillas maduras y secas, a las que se les realizó la prueba de flotación, desechando aquellas que se mantengan suspendidas en el agua. Las semillas elegidas, se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente, para desinfectarlas superficialmente. Posteriormente se escarificaron, y se germinaron en una cámara húmeda a 25 °C en obscuridad, hasta la emergencia de la radícula a través de la testa. Una vez que la radícula ha emergido y alcanzado 5 cm, se transplanta a macetas de barro que contienen una mezcla 4:1 de tierra negra y tierra vegetal. Las semillas que germinaron se sembraron a una profundidad no mayor de 10 cm., teniendo cuidado de no dañar la radícula. Se regaron diariamente. Una vez que hubo emergido la plántula se le colocó una guía por la cual se enredará, las macetas se mantuvieron a la interperie bajo las condiciones ambientales

de la Ciudad de México.

## 2.- Obtención de las semillas en desarrollo de Ipomoea purpurea.

Para la obtención de las semillas en diferentes etapas de desarrollo de Ipomoea purpurea, en mayo de 1987, se sembraron semillas maduras deshidratadas de la misma forma en que se hizo para incrementar el banco de semillas y una vez que empezó la temporada de floración, (aproximadamente en el mes de Agosto), se determinó el tiempo de desarrollo, tomando como tiempo inicial ( $t=0$ ) al día de floración y los días subsiguientes como días de desarrollo de la semilla. Es de importancia hacer notar que la flor únicamente permanece abierta de las 6:00 a las 13:00 a 14:00 hrs. del mismo día, siendo el tiempo de desarrollo de la semilla de 30 días aproximadamente.

Se realizó la cosecha de los frutos en diferentes etapas de desarrollo de la misma, desde antesis hasta semilla madura hidratada, separando en viales de plástico por día y planta en forma individual y agregándoles a cada uno 2.5 ml. de FAA (formol-ácido acético-alcohol-agua, 2:1:5:3), permaneciendo en el un mes; después de este tiempo se deshidrataron con alcoholes graduales hasta alcohol al 70% a temperatura ambiente y durante 24 hrs efectuando dos cambios y en el cual se mantuvieron hasta que se realizó la extracción del almidón.

Se realizaron dos cosechas, la primera en el mes de Octubre y la segunda en Noviembre.

### 3.- Obtención del material en etapas de germinación de Ipomoea purpurea.

Para la obtención del material biológico en diferentes etapas de germinación, se trató a las semillas maduras deshidratadas de Ipomoea purpurea en forma analoga a las utilizadas para la obtención de las plantas; con algunas leves variaciones: se colocaron ocho lotes de cinco semillas cada uno, en un germinador, los cuales se mantuvieron a temperatura ambiente y en obscuridad. Del germinador se tomaron los lotes de cinco semillas cada 24 hrs durante los siguientes 8 días, fijandolos en FAA, permaneciendo un mínimo de 72 horas en él; después de este tiempo se deshidrataron con alcoholes graduales, llegando hasta alcohol de 70%, en el que se mantuvieron hasta que se realizó la extracción del almidón.

### 4.- Obtención de las semillas en desarrollo de Ipomoea nil.

Los frutos de Ipomoea nil utilizados para la realización del trabajo fueron donados por la M. en C. Margarita Ponce (Laboratorio de Citología, Facultad de Ciencias UNAM), las cuales se colectaron a la orilla de la laguna de Xel-Ha en el Estado de Quintana Roo. El material se fijó en FAA un tiempo mínimo de 72 hrs., deshidratandose en alcoholes gra-

duales, hasta alcohol al 70%, en el cual permaneció hasta que se realizó la extracción del almidón.

#### B.-Extracción del almidón.

El material fijado en FAA se deshidrató en alcoholes graduales, hasta alcohol al 70 %. Para realizar la extracción del almidón se formaron grupos con el material biológico con base en la ontogenia de la planta: frutos, semillas y plántulas. En cada grupo encontramos material biológico en diferentes etapas de desarrollo. El grupo de los frutos se formó con el material biológico en el que, dado su tamaño, no fue posible disectar para extraer la semilla; el grupo de semillas se formó a partir de frutos en los que sí fue posible extraer la semilla, y al cual denominaremos como el grupo de semillas en desarrollo.

En el grupo de las semillas en desarrollo una vez realizada la disección del fruto, se pesaron todas las semillas, eligiendo a la de mayor peso, a la cual denominamos semilla líder (Dekhuijzen et al, 1988), y que se utilizó para la extracción del almidón. Los frutos y plántulas se utilizaron completos.

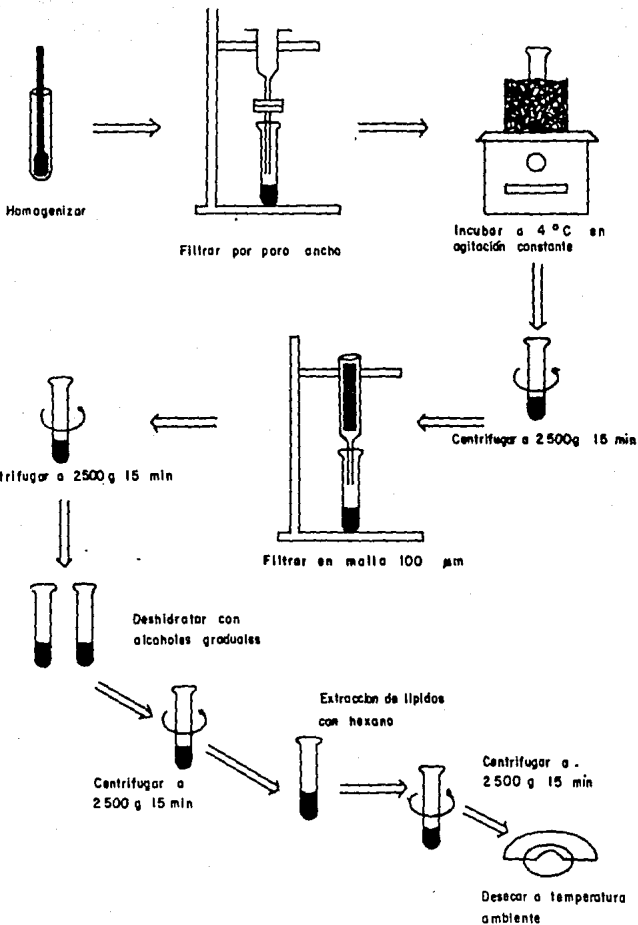
El método de extracción del almidón es una modificación del utilizado por MacGregor (1979) y Biliaderis et al (1979). En nuestro caso consistió en lo siguiente: al fruto, semilla, o plántula se le homogenizó con una solución de azida de

sodio al 0.02%, en frío, se filtró a través de filtros de poro ancho, para asegurar una completa disrupción del material. A la preparación así filtrada se le agregaron 160  $\mu$ l de solución de  $I_2$ -KI, ( $I_2$ :127 mg, KI:30 mg,  $H_2O$ :10 ml), con el fin de localizar al almidón durante los siguientes pasos de la extracción. Se dejó en agitación constante en un baño agua hielo durante una hora. Se centrifugó a 2500 g durante 15 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con solución de azida de sodio 0.02% en frío, en una proporción de 0.1 a 60 mg; se le agregó 1 ml, se filtró en una malla de 100  $\mu$ m y se volvió a centrifugar a 2500 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se deshidrató con alcoholes de concentración creciente hasta etanol al 100%, permaneciendo la muestra 20 minutos en cada uno de ellos. Al término de este tiempo se centrifugó a 2500 g 15 minutos a temperatura ambiente; el sobrenadante se retiró y el precipitado se resuspendió con hexano (Ver más adelante) para extraerle los lípidos, en una proporción de 0.1 a 60 mg se le agrega 1 ml, permaneciendo en él durante 48 horas a temperatura ambiente, realizándose dos cambios durante este lapso. Se centrifugó a 2500 g durante 10 minutos, el sobrenadante se retiró y el precipitado obtenido es la fracción enriquecida de almidón (Fig. 2).

A los extractos enriquecidos de almidón se les cuantificó su peso cada 24 hrs. hasta que éste se mantuvo constante para determinar su total desecación.

Simultáneamente con la extracción del almidón del material biológico se procesó una cantidad conocida de almidón comercial de papa a manera de control; uno por cada lote de muestras, con el fin de determinar la eficiencia del método de extracción.

Figura 2.- Obtención de la fracción enriquecida de almidón del material biológico. Los gránulos de almidón se extrajeron en una solución de azida de sodio 0.02%, se filtró el material por una malla de 100  $\mu\text{m}$  y se extrajeron los lípidos usando hexano.





### C.-Extracción de lípidos.

Al cuantificar la cantidad de almidón por el método espectrofotométrico, se observó que además del almidón existen otros compuestos que están asociados a él y que al igual que éste reaccionan con el yodo, por ejemplo los lípidos, lo cual nos puede alterar los resultados, por lo que se hace indispensable eliminarlos del extracto enriquecido de almidón.

Para determinar el solvente con el que se iba a extraer a los lípidos se realizó el siguiente experimento: se procesó una cantidad conocida de papa (Solanum tuberosum) la cual se homogenizó con solución de azida de sodio 0.02% en frío, el homogenizado se incubó a 4 °C en agitación constante durante una hora, se filtra por una malla de 100 µm y se deseca a temperatura ambiente. Se toma una cantidad conocida del extracto y se solubiliza en una proporción 1:30 (P/V) en cuatro diferentes solventes: metanol al 85% y etanol al 85% (Biliaderis et al, 1981), dimetil sulfoxido (DMSO) al 90% (Knutson et al, 1982) y hexano (comunicación personal Dra. Pérez-Amador). Las soluciones de almidón en metanol y etanol se incubaron a una temperatura de 60 °C y en agitación constante durante 48 horas, realizando durante este lapso dos cambios del solvente. La solución en DMSO se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación constante 48 horas, realizando dos cambios del solvente; esta muestra se gelificó, por lo

que se le hicieron lavados con alcohol al 96% para precipitar el almidón. El almidón que se solubilizó en hexano se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación constante durante 48 horas, realizando dos cambios del solvente. Transcurrido el tiempo de incubación de las soluciones tratados con los cuatro diferentes solventes, las muestras se desecaron a temperatura ambiente en el desecador con flujo continuo de aire. Ya secas las muestras, se solubilizó una cantidad conocida de éstas, al igual que cantidades iguales de extracto de papa sin tratar, almidón comercial de papa y almidón para análisis de Merck a manera de control y como testigos respectivamente, con agua destilada en una proporción de 1:1000 (P/V), las suspensiones se colocaron en un baño de agua a ebullición durante 15 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se completaron los volúmenes perdidos por evaporación; de las soluciones de almidón tratadas con diferentes solventes se toman alícuotas que van de 20 a 500  $\mu$ l, a las cuales se les agregaron 20  $\mu$ l de solución de  $I_2$ -KI ( $I_2$ :127 mg, KI:30 mg,  $H_2O$ : 10 ml), (Ver más adelante) y se determinó su absorbencia a 620 nm.

D.-Determinación de la cantidad de solución de yoduro de potasio para saturar al almidón.

La reacción del yodo con el almidón produce un color azul, basandonos en esta reacción podemos determinar la cantidad de almidón contenida en una muestra usando el método espectrofotométrico (Knutson et al, 1982). Para determinar

la cantidad de yodo necesaria para saturar al almidón y que éste no sea un factor limitante que afecte la cuantificación de la cantidad de almidón, se procedió a realizar un ensayo, el cual consistió en lo siguiente: se preparó una solución de almidón soluble para análisis de Merck 0.01 g/ml, se colocó en un baño a ebullición durante 15 minutos, para solubilizar al almidón. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se recuperó el volumen perdido por evaporación, de la solución se toman alícuotas y se hacen diluciones a seis concentraciones diferentes que van de 50 a 500 µg/ml. Para formar el complejo yodo-almidón se agregan diferentes volúmenes de una solución I<sub>2</sub>-KI (I<sub>2</sub>:0.127 g, KI:0.3 g, H<sub>2</sub>O:10 ml), que van de 10 a 150 µl, completando el volumen final a 1 ml con H<sub>2</sub>O destilada y determinando su absorbencia a 620 nm.

#### E.- Cuantificación del almidón de las fracciones enriquecidas.

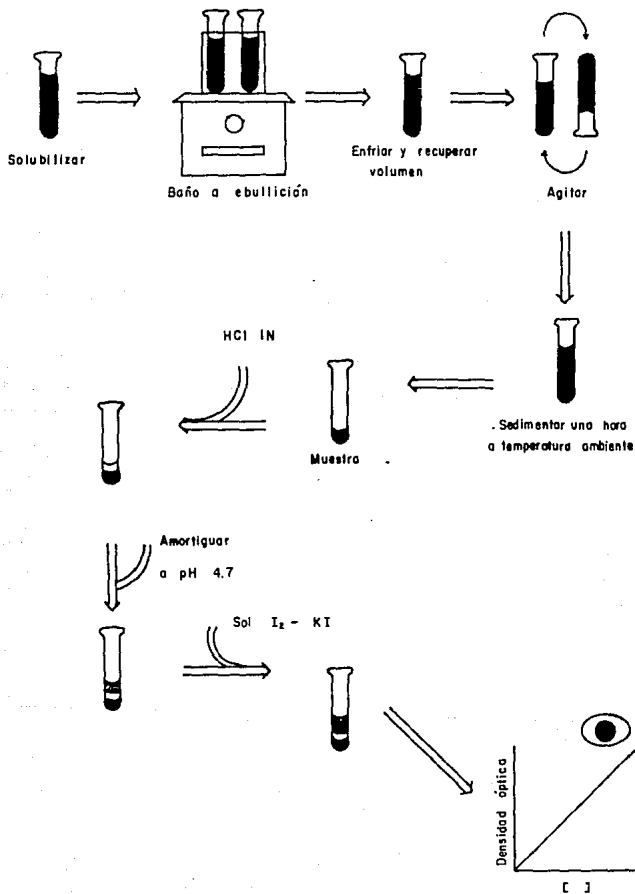
Debido a que la cuantificación del almidón se realizó mediante el método yodométrico que a continuación se explica, se requiere de solubilizar la muestra. Como este punto es crítico en la determinación, se realizó un ensayo consistente en solubilizar la muestra en un volumen conocido de KOH 0.5 N (Juliano 1971), tomando una alícuota a las 24, 48 y 72 horas, la cual posteriormente se centrifugó a 2500 g durante 15 minutos. El sobrenadante se retira y el precipitado se acidificó con HCl 1 N. Se agrega una solución I<sub>2</sub>-KI acidulada (I<sub>2</sub>:1270 mg, KI:300 mg, HCl 1 N:22.2 µl, H<sub>2</sub>O:10 ml) al

precipitado y se determinó cualitativamente la cantidad de almidón contenida en el precipitado. Observándose que la gelificación es completa a las 72 horas. Conjuntamente para comprobar que el material no sufre algún daño o deterioro durante este proceso se trabajaron dos controles: uno de almidón soluble para análisis de Merck y el otro de amilosa de papa tipo III de Sigma, se gelificaron con KOH 0.5 N, se tomaron alicuotas a las 24, 48 y 72 horas, acidificandolas con HCl 1 N, y posteriormente se amortiguó, con un amortiguador de acetatos 0.2 M pH 4.7, se agregó 20  $\mu$ l de solución de  $I_2$ -KI acidulada y se determinó su absorbencia a 620 nm.

El método utilizado para la cuantificación de la cantidad del almidón es una modificación del diseñado por Juliano (1971) y Laundry y Smith (1988). El cual en nuestro caso consistió en lo siguiente: el extracto enriquecido de almidón de peso conocido se gelificó en un volumen de 1 a 5 ml de KOH 0.5 N, dependiendo de la cantidad de muestra, manteniendose en él 72 horas. Simultaneamente se trató una cantidad conocida de almidón soluble para análisis de Merck a manera de referencia. Transcurrido este tiempo y para asegurar una completa gelificación del almidón, se colocaron las soluciones de las muestras en un baño de agua a ebullición durante 30 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente; se recuperó el volumen perdido por evaporación, se agitaron las muestras y se dejó sedimentar durante una hora, después de este tiempo se tomo una alicuota de 1 ml, la cual fue neutralizada con HCl 1 N. Se toma una alicuota que se amortigua a

pH 4.7 con amortiguador de acetatos 0.2 M y agregan a cada muestra 20  $\mu$ l de solución de  $I_2$ -KI acidulada, se agitan y se determina su absorbencia a 620 nm (Fig. 3).

Figura 3.- Método de cuantificación de la cantidad de almidón. La fracción enriquecida de almidón se solubilizó en KOH 0.5 N, durante 72 horas, se tomó una alícuota, la cual se acidificó con HCl 1 N y amortigua a pH 4.7 con amortiguador de acetatos 0.2 M. Para formar el complejo yodo-almidón, agregamos solución  $I_2$ -KI y se determina su absorbencia a 620 nm.



#### F.- Espectros de absorción de las fracciones enriquecidas de almidón.

Con el fin de determinar, si el producto final de la extracción, está enriquecido en almidón o contiene otros elementos, se procedió a obtener sus espectros de absorción.

Utilizando las muestras a las que se les cuantificó la cantidad de almidón por el método yodométrico, se les determinó su absorbancia entre 400 y 700 nm, con un intervalo de 10 nm.

#### G.- Análisis exploratorio de los datos.

El análisis exploratorio de los datos, es una técnica que se utiliza para analizar los datos, se centra en métodos aritméticos que se basan en la representación gráfica (Tukey, 1977).

El análisis exploratorio nos permite observar las características que presentan los datos, haciendo resaltar sus tendencias y poder proponer un modelo que nos describa el comportamiento de nuestros resultados.

Para realizar el análisis exploratorio de los datos, se utiliza el análisis de regresión, el cual trata de la depen-



dencia de una variable con una o más variables, con el objeto de estimar o predecir la media de la primera con base en los valores conocidos de las segundas. El análisis de regresión se ocupa de lo que se conoce como dependencia estadística entre variables. En él nos interesa tratar de estimar o predecir el valor promedio de una variable con base en los valores fijos de otras (Gujarati, 1989).

Con el análisis exploratorio de los datos se pretende encontrar la representación gráfica más conveniente para los resultados. Para lograr este fin, se han desarrollado varios métodos. En Biología, los más comunes y que pueden ser lineales en sus parámetros o que pueden adquirir esta condición son: (1) log-lineal o exponencial; (2) doble-log o potencial; (3) transformaciones recíprocas; (4) ecuaciones diferenciales (logística y logit) (Lotka, 1956; Maynard, 1989; Gujarati, 1989).

La ecuación diferencial de tipo logit nos permite transformar un comportamiento de forma sigmoidal en una recta, utilizando el logaritmo del cociente del valor observado de la variable dependiente entre la diferencia que hay del valor máximo y el valor observado, de la misma variable, relacionándolo con el logaritmo de la variable independiente y de esta forma encontrar el punto de inflexión de la curva.

Dentro del análisis exploratorio existe la suavización,

que es un método que nos permite determinar la tendencia que existe dentro de los datos. Este método está basado en la obtención de la mediana y el trazo a través de ellas.

## VII RESULTADOS

### A.- Evaluación de las técnicas de extracción y cuantificación de los extractos enriquecidos de almidón.

Una vez obtenidos los extractos enriquecidos de almidón del material biológico, se procedió a evaluar la eficiencia de la técnica de extracción. Con este propósito se cuantificó el peso seco del control de almidón de papa comercial, que se procesó de igual forma que el material biológico. Por cada lote de 6 a 16 muestras de material, se procesó un control, siendo el número de éstos de 22 en total. De cada control se cuantificó su peso al inicio ( $P_i$ ) y al final ( $P_f$ ) de la técnica. El valor que se obtiene al multiplicar el cociente del  $P_f/P_i$  por 100, es la eficiencia de extracción; se obtuvo un valor promedio de  $89.16 \pm 2.20\%$  de recuperación del peso del almidón control.

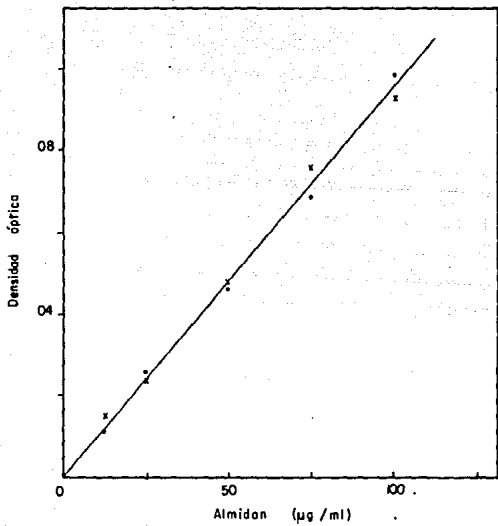
Como ya se mencionó, el almidón utilizado como control fue un almidón de papa comercial, lo cual pone en duda la pureza del polisacárido, surgiendo la pregunta de que si durante la extracción, se eliminaron las impurezas y no el carbohidrato, lo que afectaría nuestros resultados, haciendo que los datos que obtuvimos se vieran encubiertos. Para desechar esta posibilidad, se compararon las densidades ópticas de curvas patrón de almidón comercial antes y después de aplicar la técnica de extracción y no se encontraron

diferencias entre ellas.

Por otra parte, con el fin de saber si existían diferencias en cuanto a la capacidad de formación del complejo yodo-almidón entre el control comercial de papa y el almidón soluble para análisis de Merck, se compararon curvas patrón de ambos almidones, observándose que las pendientes son muy semejantes. (Fig. 4)

Un parámetro de importancia en la evaluación de la técnica de cuantificación del almidón de los extractos enriquecidos, es el valor del error interensayo. Para obtener este parámetro se utilizaron los valores de las pendientes de las curvas de almidón soluble para análisis de Merck, que se usaron como referencia, obteniéndose un valor de variación de 2.2%.

Figura 4.- Formación del complejo yodo-almidón del almidón soluble para análisis de Merck y del almidón de papa comercial. El almidón se solubilizó en agua destilada y se incubó en un baño a ebullición durante 15 minutos. Se observa que no existen diferencias entre las pendientes del almidón soluble para análisis de Merck (●-●) y el almidón comercial de papa (x-x).



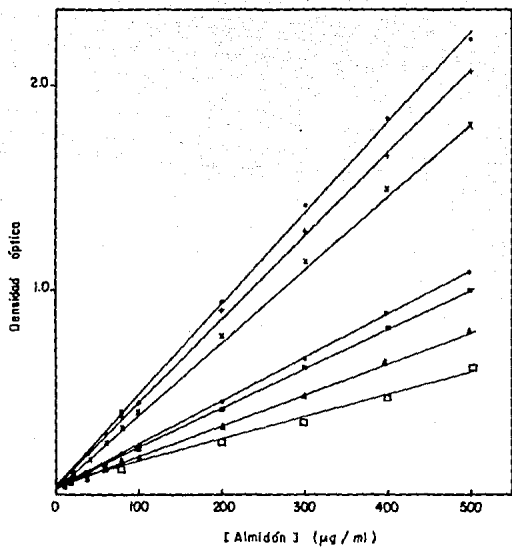
## B.- Extracción de lípidos.

Algunos compuestos que se encuentran asociados al gránulo de almidón, como los lípidos, reaccionan con el yodo, lo cual puede alterar nuestros resultados, ya que puede quedar una cantidad de almidón sin formar el complejo, por lo que se hace necesario eliminar a los lípidos de la muestra. Para esto se realizó un ensayo en el que al extracto enriquecido de almidón de papa, se le trató con diferentes solventes con el fin de extraer los lípidos asociados, determinándoles su absorbencia a 620 nm. Al graficar los resultados, observamos que el valor de las pendientes de las curvas para los almidones tratados con DMSO, metanol y etanol, es similar al del almidón de papa sin tratar. En tanto que para el extracto de almidón de papa tratado con hexano, su pendiente es similar a las pendientes de los almidones de papa comercial y soluble para análisis de Merck, que sirvieron como testigos. (Fig. 5). Estos resultados indican indirectamente que los lípidos no fueron eliminados en las muestras tratadas con DMSO, metanol y etanol, pero con el hexano sí se extrajeron.

Con base en estos resultados, se optó por utilizar al hexano como solvente para extraer a los lípidos del extracto enriquecido de almidón, durante la obtención de éste último.

Figura 5.- Comparación de la formación de complejos yodo-almidón tratados con diferentes solventes para eliminar los lípidos. Los gránulos de almidón se extrajeron en una sol. de azida de sodio 0.02% y a los extractos enriquecidos se les extrajeron los lípidos con DMSO al 90% y hexano a temperatura ambiente y metanol y etanol al 85% a 60 °C, todos en agitación constante durante 48 horas, con dos cambios de solvente durante este tiempo, utilizando como control extracto de almidón de papa solubilizado en agua destilada y como testigos almidón comercial de papa y almidón para análisis de Merck. DMSO (□-□), Extracto de almidón de papa (▲-▲), Etanol (■-■), Metanol (○-○), Hexano (↑-↑), almidón comercial (●-●) y almidón soluble para análisis de Merck (x-x).





C.- Determinación de la cantidad de solución de yodo-yoduro de potasio necesaria para saturar al almidón.

Debido a que el yodo puede ser un factor limitante durante la cuantificación de almidón contenido en los extractos enriquecidos, se procedió a determinar la cantidad necesaria de solución de yodo-yoduro de potasio necesaria para saturar al almidón. Para ello se determinó la absorbencia del complejo yodo-almidón.

Observamos que tomando una cantidad constante de almidón e incrementando la cantidad de  $I_2-KI$  se tiene un patrón, en el que a medida que la concentración de  $I_2-KI$  aumenta, la densidad óptica se incrementa llegando a un punto en el que tiende a ser constante; en general el complejo yodo-almidón sigue un comportamiento hiperbólico (Fig. 6a). Este patrón lo podemos linearizar al graficar por doble inverso, en donde el punto de intersección en el eje de las ordenadas es la densidad óptica máxima que alcanzaría el complejo yodo-almidón para una cantidad ~~de~~ de  $I_2-KI$  para las diferentes cantidades de almidón (Fig. 6b). Si relacionamos la densidad óptica máxima, que obtenemos a partir de la Fig. 6b, con la concentración de almidón, observamos un patrón lineal (Fig. 7); lo que implica que el almidón contenido en las muestras se ha saturado con la solución de  $I_2-KI$ .

Para determinar el porcentaje de saturación que se posee para las diferentes concentraciones de yodo para una cantidad

dada de almidón, se transforma la densidad óptica original en porcentaje de saturación, utilizando el cociente de densidad óptica original entre densidad óptica máxima y el resultado se multiplica por cien. Los valores que se obtuvieron se graficaron contra la concentración de la solución  $I_2$ -KI, presentándose un patrón de comportamiento hiperbólico (Fig. 8a) del cual se observa que las curvas llegan a un máximo de 90% de saturación, que lo podemos linearizar cuando graficamos por doble recíproca (Fig. 8b). Por interpolación se calculan las concentraciones de almidón que corresponden al 85 y 90% de concentración de solución  $I_2$ -KI.

Al graficar la concentración de almidón contra la concentración de solución  $I_2$ -KI, para 85% y 90% de concentración de solución  $I_2$ -KI (Fig. 9a), se observa un patrón hiperbólico. el cual podemos linearizar graficando por doble inverso (Fig. 9b). Al interpolar para una concentración de 500 mg de almidón para 85 y 90% de saturación, corresponde a 106 y 168  $\mu$ l respectivamente de solución de  $I_2$ -KI; si la concentramos diez veces se requerirán 10.6  $\mu$ l para el 85% de saturación y 16.8  $\mu$ l para el 90%.

Con base en los resultados que se obtuvieron, se determinó que la cantidad necesaria para saturar al almidón en cantidad máxima de 500 mg sería de 20  $\mu$ l de solución de  $I_2$ -KI 10X, evitando así que el yodo fuera un factor limitante en la formación del complejo yodo-almidón y que esto afectara nuestros resultados al realizar la cuantificación del polisacárido.

Figura 6.- Patrón de comportamiento del complejo yodo-almidón. A. concentraciones constantes de almidón soluble para análisis de Merck, de 50 a 500  $\mu\text{g/ml}$  se les agregaron cantidades crecientes de solución  $\text{I}_2\text{-KI}$ , de 0 a 170  $\mu\text{l}$  y se les determinó su absorbencia a 620 nm. A.- Patrón de comportamiento de los complejos yodo-almidón a diferentes concentraciones del polisacárido. B.- Linearización por doble recíproco del patrón de comportamiento de los complejos yodo-almidón. (o-o) 50, (x-x) 100, (A-A) 150, (a-a) 200, (++) 250 y (■-■) 500  $\mu\text{g/ml}$  de almidón.

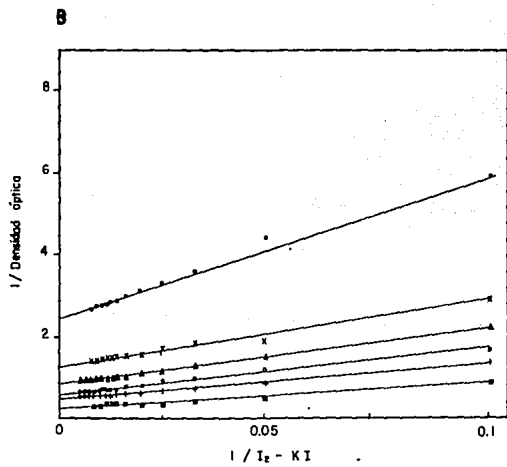
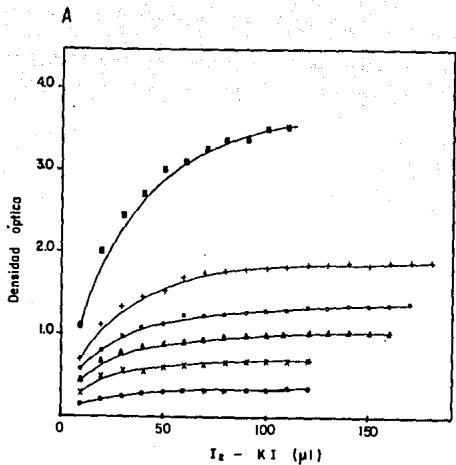


Figura 7.- Densidad óptica máxima en relación a la concentración de almidón. Con la linealización por doble inverso se obtuvo la densidad óptica máxima, de los complejos yodo-almidón y se relacionó con la concentración del polisacárido, observándose un patrón lineal.

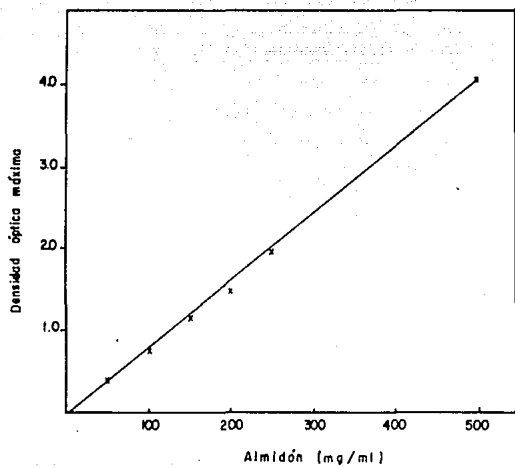
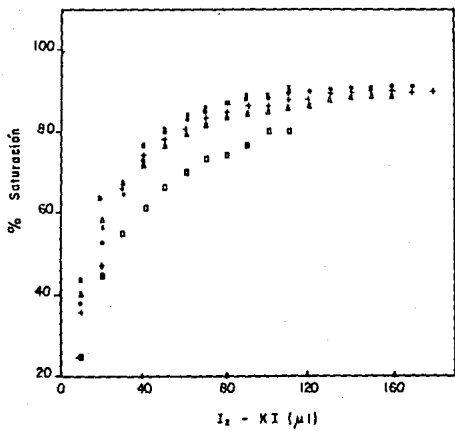


Figura 8.- Porcentajes de saturación de los complejos yodo-almidón. A.- Se obtuvieron los porcentajes de saturación para las diferentes concentraciones de almidón, dividiendo la densidad óptica de cada uno de los complejos entre sus densidades ópticas máximas y el resultado se multiplicó por cien, estos valores se relacionaron con la concentración de  $I_2-KI$  y se observó un comportamiento de tipo hiperbólico. B.- Estos valores se linearizaron por dobles recíprocos y se pudo interpolar para las concentraciones de almidón. yodo-almidón para las diferentes concentraciones de almidón. (o-o) 50, (x-x) 100, (A-A) 150, (e-e) 200, (+++) 250 y (U-U) 500  $\mu g/ml$  de almidón.



A



B

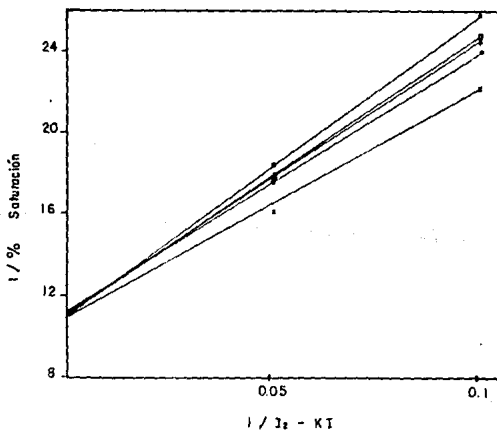
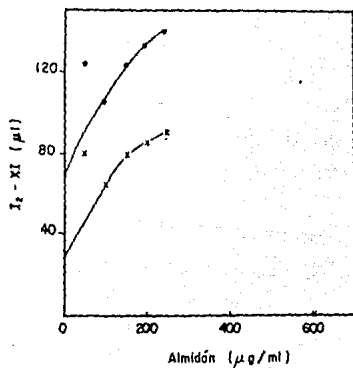
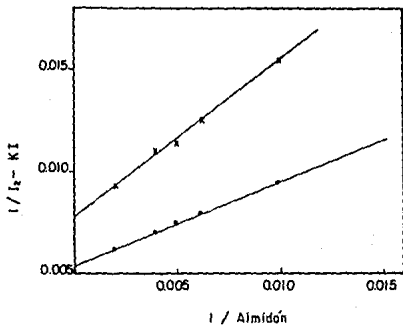


Figura 9.- Cantidad de solución  $I_2$ -KI en relación a la concentración de almidón. Interpolando las concentraciones de almidón correspondientes al 85 y 90 % de saturación para cada uno de los complejos yodo-almidón se pudieron relacionar con las cantidades de solución de  $I_2$ -KI, observándose un patrón hiperbólico. A.- 85 % y 90 % de saturación. B.- Valores linearizados por dobles recíprocos de los cuales se interpoló la cantidad necesaria de solución  $I_2$ -KI para saturar 500 mg de almidón. (x-x) 85 y (●-●) 90 % de saturación.

A



B



D.- Análisis del crecimiento de frutos y semillas en desarrollo de Ipomoea purpurea.

Cuando analizamos el crecimiento de frutos y semillas en desarrollo de Ipomoea purpurea en la cosecha de Octubre observamos que el peso fresco se incrementa a medida que aumenta el tiempo de desarrollo.

Para los frutos observamos que el peso fresco se incrementa presentando una fase en la que aparentemente no hay cambios, del tiempo cero (antesis) a más o menos cuatro días y que apartir de los 5 días se dá un incremento en el peso fresco. (Fig. 10). Para las semillas lider el incremento del peso fresco con respecto al tiempo presenta tres fases: la primera fase que va de 8 a 12 días de desarrollo, en la que se observa un pequeño incremento, la segunda fase de los 12 a los 22 días, en la que el peso fresco aumenta considerablemente de 7 a 28 mg y por último la fase de meseta de 22 a 31 días en la que el peso fresco se incrementa ligeramente (Fig. 11a).

Por otra parte, al realizar un análisis exploratorio de los datos que se obtuvieron para las semillas lider, observamos que al modelo al que mejor se ajustan es una ecuación diferencial de tipo logit (Lotka, 1956) (Fig. 11b). Al realizar la transformación de las variables para este modelo, el logaritmo del cociente del valor observado de la variable dependiente entre la diferencia que hay del valor máximo, en

este caso 35 mg y el valor observado de la misma variable y relacionarlo con el logaritmo de la variable independiente, se presenta un ajuste lineal, el cual nos facilita la interpolación y nos permite el hacer predicciones sobre el comportamiento que se sigue durante el desarrollo de la semilla.

Al analizar este modelo observamos que el punto de inflexión está en los 17 días de desarrollo (Fig. 11b).

Este ajuste lineal (Fig. 12a) cumple con los supuestos del modelo de regresión clásico; el cual supone que no hay autocorrelación en los residuos ( $u_i$ ), es decir, que no hay correlación entre los miembros de una serie de observaciones ordenadas en el tiempo o en el espacio con una distribución al azar de los residuos (Fig. 12b). Un método analítico que puede sustituir al método gráfico, proporcionando una prueba estadística para establecer si el patrón no aleatorio de los residuos es estadísticamente significativo, es la prueba estadística Durbin-Watson, que resultó no significativa para nuestros datos y nos confirma que no hay autocorrelación entre nuestros resultados.

Otro de los supuestos importantes del modelo de regresión lineal clásico consiste en que la varianza de cada residuo elevado al cuadrado, condicional a los valores escogidos de las variables explicatorias, es una constante igual a la varianza. Este es el supuesto de homoscedasticidad, el cual se puede evaluar observando si los valores de los resi-

duos elevados al cuadrado, al ser relacionados con los valores esperados para la variable dependiente, siguen un patrón de comportamiento o se distribuyen estocásticamente, es decir, al azar; se encontró que la varianza condicional de los residuos elevados al cuadrado (RESIDUOS 2), de nuestros resultados es constante u homoscedástica (Fig. 12c).

Al aplicar los análisis de regresión y de varianza a nuestros datos encontramos que, para las pruebas estadísticas de t y F, éstas son significativas a un valor de casi el 100%. Para una mejor comprensión de los resultados que se obtuvieron se presenta la Tabla I.

Tabla I.- Análisis de regresión para los datos de las semillas líder de las plantas de Ipomoea purpurea cosecha de Octubre.

Análisis de regresión:

Variable dependiente $\ln(P/P_{\max}-P)$		Variable independiente $\ln t$		
Parámetro	Estimación	Error estándar	Valor prueba t	Nivel de probabilidad
Ordenada al origen	-14.53440	0.901200	-16.1278	0
Pendiente	5.20007	0.324058	16.0467	0

Análisis de Varianza:

Origen	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	Prueba de F	Nivel de probabilidad
Modelo	124.08616	1	124.08616	257.4975	0.00000
Error	16.86624	35	0.48189		

Correlación

total 140.9524 36  
 Coeficiente de correlación= 0.938265  
 Error estándar de estimación= 0.694185  
 Coeficiente de determinación= 88.03%  
 Durbin-Watson= 2.03551

Figura 10.- Incremento en el peso fresco durante el desarrollo de los frutos de Ipomoea purpurea.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

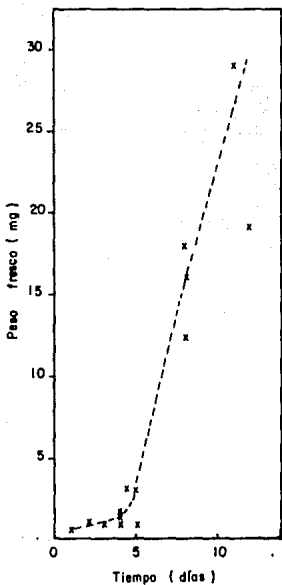




Figura 11.- Patrón de comportamiento que presentan las semillas líder de las plantas de Ipomoea purpurea de la cosecha de Octubre. A.- Incremento en el peso fresco durante el desarrollo de las semillas líder de Ipomoea purpurea. B.- Transformación de las variables del crecimiento de las semillas líder de Ipomoea purpurea, tomando a 35 mg como peso fresco máximo.

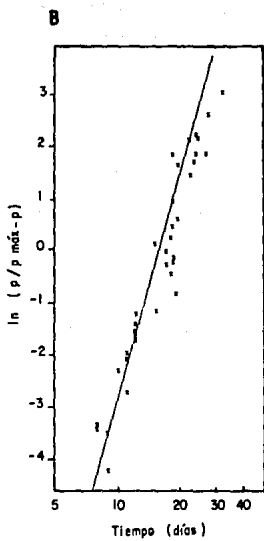
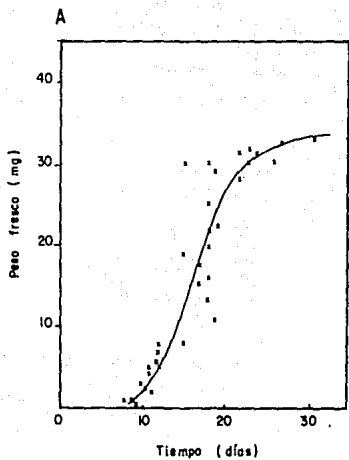
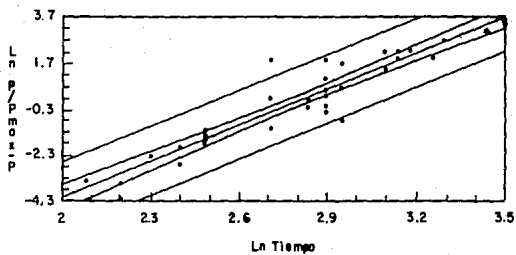
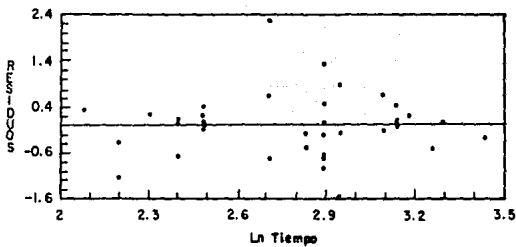
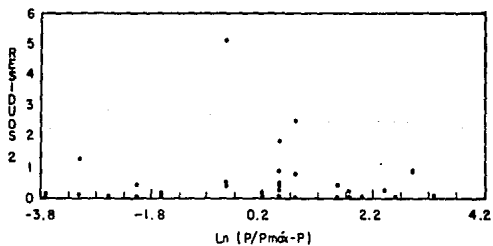


Figura 12.- Análisis de regresión del crecimiento de semillas de Ipomoea purpurea. A.- Transformación de los pesos frescos de las semillas líder con base en una ecuación diferencial de tipo logit, en la que se toma como peso fresco máximo 35 mg, para la cual los valores de la pendiente 5.2 y la ordenada al origen -14.53 son significativos a una prueba de T a un valor de casi el 100% y cuyo valor para el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) es de 88.03%, siendo estos valores significativos a un valor de casi 100% para la prueba de F al aplicar un análisis de varianza. Y en la en la cual se cumple con los supuestos del modelo de regresión clásico: B.- no autocorrelación en las perturbaciones, lo cual se confirma con el valor del estadístico Durbin-Watson el cual no es significativo. C.- la varianza condicional de las perturbaciones es constante u homoscedástica. NOTA: Residuos 2 es el valor de los residuos elevados al cuadrado.

**A****B****C**

E.- Cuantificación del almidón de las fracciones enriquecidas de los frutos, semillas en desarrollo y germinados de Ipomoea purpurea.

La cuantificación del almidón de los extractos enriquecidos de los frutos y semillas en desarrollo de Ipomoea purpurea, se realizó en dos partes: una la cosecha de Octubre y la otra la cosecha de Noviembre.

Cuando analizamos el patrón de comportamiento que sigue el almidón durante el desarrollo para la cosecha de Octubre, se observa que la cantidad de almidón se incrementa a medida que transcurre el tiempo de desarrollo. Para los frutos durante los primeros días del desarrollo, de 0 a 5 días, la cantidad de almidón permanece sin cambio aparente (Fig. 13a). En las semillas se observa que la cantidad de almidón se incrementa a partir de los 8 días alcanzando su valor máximo entre los 17 y los 19 días de desarrollo. La cantidad de almidón decrece a partir de los 19 días, llegando a estabilizarse a los 26 días entre 280 y 400 ug de almidón aproximadamente (Fig. 13a). En los días 17, 18 y 19 días de desarrollo, existen puntos en los que la cantidad de almidón que presentan no corresponde al tiempo de desarrollo que tienen las semillas, según el patrón general (Fig. 13a). Al aplicar el método de la suavización a los valores obtenidos para las semillas (Fig. 13b), se observa que se presentan dos focos en la curva, una ascendente y la otra descendente; la primera corresponde al tiempo de 8 a 19 días de desarrollo,

en los que la cantidad de almidón se incrementa hasta alcanzar su valor máximo y la segunda fase, la descendente, en la que se da un decremento en la cantidad de almidón y que corresponde al tiempo de 19 a 30 días de desarrollo de la semilla, confirmando lo observado anteriormente.

Observando los cambios en la cantidad de almidón versus peso fresco, en los frutos que poseen un peso menor a 5 mg, no hay cambio aparente en la cantidad de almidón (Fig. 14a). En cuanto a las semillas, el patrón que se presenta tiene dos fases: la primera que involucra a las semillas con un peso fresco que va de 0.5 a 23 mg, en la que se da un incremento en la cantidad de almidón alcanzando su valor máximo entre los 18 y los 23 mg, y la segunda fase en la que se observa un decremento en la cantidad de almidón, la cual se inicia una vez que se ha alcanzado el valor máximo, tendiendo a estabilizarse a medida que transcurre el desarrollo de la semilla (Figs. 14a y 14b).

Si relacionamos los datos de cantidad de almidón con respecto al tiempo de desarrollo y la cantidad de almidón con respecto al peso fresco (Figs. 13a y 14a), tenemos que las semillas que presentan pesos entre los 20 y los 25 mg, corresponden al peso fresco que tiene la semilla entre los 17 y los 19 días de desarrollo; además observamos que los puntos de 17, 18 y 19 días que no seguían el patrón en la gráfica de tiempo, con semillas que presentan una menor cantidad de almidón que la que corresponde a su tiempo de desarrollo, al

graficarlos respecto a su peso fresco, se encontró que caen dentro de la curva.

Si consideramos la proporción entre la cantidad de almidón con respecto al incremento en peso fresco, observamos que para los frutos la proporción decrece conforme el peso fresco se incrementa, alcanzando un valor mínimo; el incremento en el peso de la semilla se inicia a partir de este valor (Fig. 15a). En cuanto a las semillas, observamos que en general, conforme aumenta el peso fresco de la semilla, la proporción de almidón se incrementa alcanzando un valor máximo entre los 15 y 20 mg de peso fresco, iniciándose un decremento en la proporción de almidón a partir de este valor, que tiende a estabilizarse a partir de los 30 mg de peso fresco de la semilla. Se observa también que los tres primeros puntos presentan una proporción de almidón mayor a la que les corresponde dentro del patrón general (Fig. 15b).

En cuanto a la cosecha de Noviembre, la cantidad de almidón a medida que transcurre el tiempo de desarrollo, es el siguiente: para los frutos en los primeros días, 1 a 4 días permanece sin cambio aparente (Fig. 16). En las semillas el incremento se inicia a los 6 días de desarrollo, alcanzando su valor máximo entre 11 y 13 días y sufre un decremento a partir de este tiempo. Se observa una gran dispersión en los datos (Fig. 16).

Cuando consideramos como parámetro de desarrollo el

incremento en peso fresco; observamos que para los frutos en pesos menores a 6 mg no hay cambio aparente en la cantidad de almidón (Fig. 17a). En las semillas se presentan dos fases: la primera en la que se observa un incremento en la cantidad de almidón a partir de 6 mg, hasta 36 mg, alcanzando su valor máximo entre los 22 y los 36 mg de peso fresco, a partir del cual se inicia la segunda fase en la que se observa un decremento, que tiende a estabilizarse a partir de los 42 mg de peso (Fig.17a). Al aplicar el método de la suavización, se confirma que la fase de meseta es más larga que en la de las semillas de las cosecha de Octubre (Fig. 17b).

Al relacionar los valores de cantidad de almidón con respecto al tiempo de desarrollo y la cantidad de almidón con respecto al peso fresco (Figs. 16 y 17a), observamos que los pesos frescos de las semillas, en los que se alcanza el valor máximo en la cantidad de almidón, corresponde a los 14 días de desarrollo.

Si consideramos como parámetro de desarrollo, la proporción entre la cantidad de almidón con respecto al incremento en peso fresco, observamos, que en los frutos la proporción decrece conforme el peso fresco se incrementa, alcanzando un valor mínimo, a los 8 mg; se inicia un incremento a partir de este valor (Fig. 18a). Para las semillas, conforme aumenta el peso fresco, la proporción de almidón se incrementa alcanzando su valor máximo entre los 20 y 23 mg de peso fresco, decreciendo a partir de este valor



(Figs. 18a y 18b).

Al comparar las cosechas de Octubre y Noviembre observamos que los patrones son similares, variando entre ellos los valores de la cantidad de almidón y la proporción de este polisacárido, así como en los tiempos y pesos frescos en los que se presentan los valores máximos. También se observa que la dispersión entre los datos es mayor en la cosecha de Noviembre que en la cosecha de Octubre.

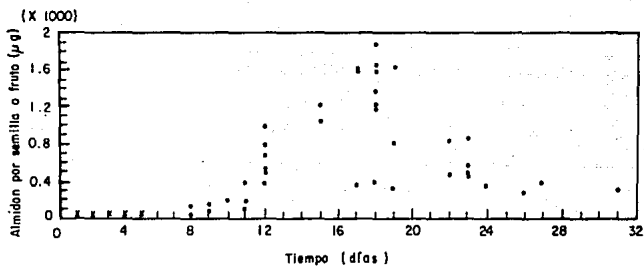
De las plántulas de L. purpurea obtenidas después de 8 días de iniciada la imbibición, se obtuvo la fracción enriquecida de almidón y se le determinó la cantidad de éste. Al realizar la cuantificación del almidón del extracto enriquecido de las plántulas en diferentes etapas postimbibición, se observa que la cantidad máxima de almidón se tiene durante los tres primeros días de germinación, la que es similar a los valores que encontramos en las fracciones enriquecidas de las semillas maduras hidratadas, que va decreciendo conforme transcurre el tiempo de germinación, tendiendo a mantenerse constante a partir de los 6 días de desarrollo (Fig 19a). Cabe hacer notar que este almidón es un remanente del sintetizado durante el desarrollo de la semilla.

Si consideramos la proporción de almidón conforme se incrementa el peso fresco como parámetro de desarrollo, observamos que los niveles máximos de almidón se presentan durante los primeros días y a medida que la plántula se va

desarrollando, la cantidad del polisacárido decrece considerablemente (Fig. 19b).

Figura 13. A.- Cantidad de almidón con respecto al tiempo de desarrollo en frutos y semillas de Ipomoea purpurea cosecha de Octubre. Los gránulos de almidón se extrajeron en una sol. de azida de sodio 0.02%, se filtró el material por una malla de 100  $\mu$ m y se extrajeron los lípidos mediante hexano. frutos (x-x), semillas (o-o). B.- Suavización del patrón de comportamiento de la cantidad de almidón en semillas de Ipomoea purpurea.

A



B

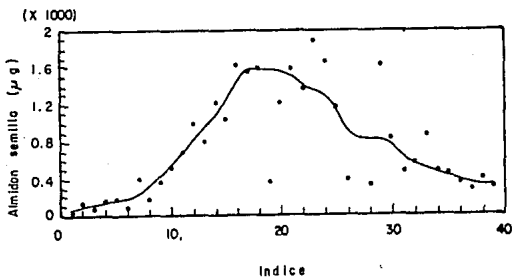
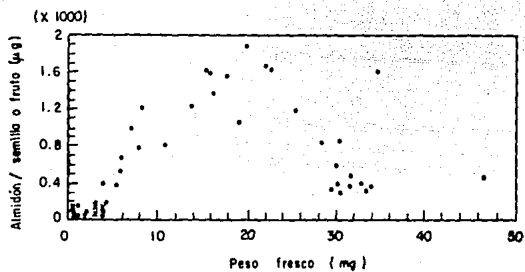


Figura 14. A.- Cantidad de almidón con respecto al peso fresco en frutos y semillas de Ipomoea purpurea cosecha de Octubre. Los gránulos de almidón se extrajeron en una sol. de azida de sodio 0.02%, se filtro el material por una malla de 100  $\mu\text{m}$  y se extrajeron los lípidos con hexano. frutos (x-x.) semillas (o-o). B.- Suavización del patrón de comportamiento de la cantidad de almidón en las semillas de Ipomoea purpurea.

A



B

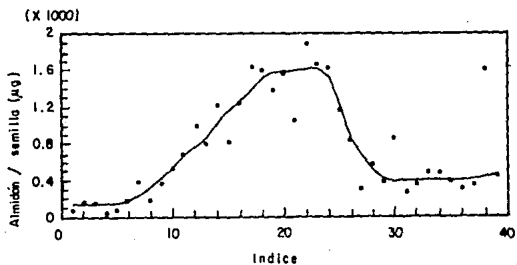


Figura 15. A.-Proporción de almidón con respecto al incremento peso fresco en frutos y semillas de *Ipomoea purpurea* cosecha de Octubre. Los gránulos de almidón se extrajeron en una sol. de azida de sodio 0.02%, se filtró el material por una malla de 100  $\mu\text{m}$  y se extrajeron los lípidos mediante hexano. frutos (x-x), semillas (o-o). B.- Suavización del patrón de la proporción de almidón en semillas de *Ipomoea purpurea*.

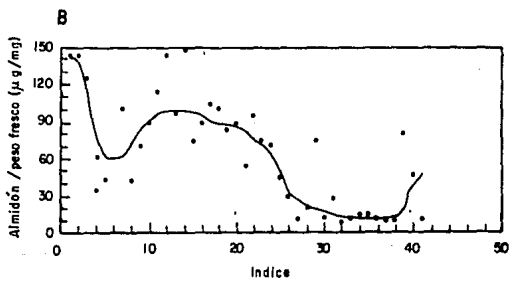
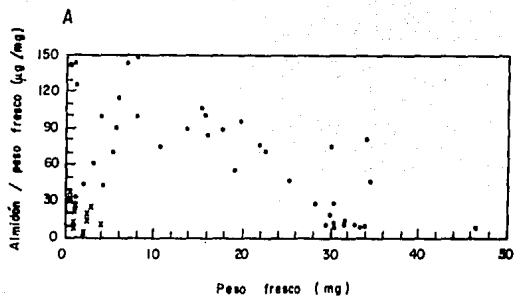




Figura 16.- Cantidad de almidón con respecto al tiempo de desarrollo en frutos y semillas de Ipomoea purpurea cosecha de Noviembre. Los gránulos de almidón se extrajeron en una sol. de azida de sodio 0.02%, se filtro el material por una malla de 100  $\mu\text{m}$  y se extrajeron los lípidos mediante hexano. frutos (x-x), semillas (o-o).

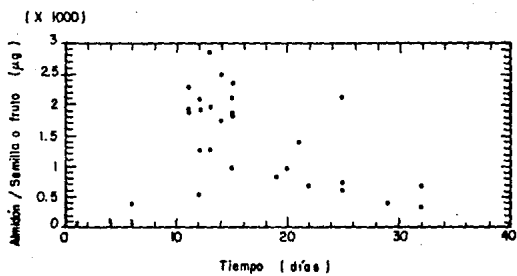
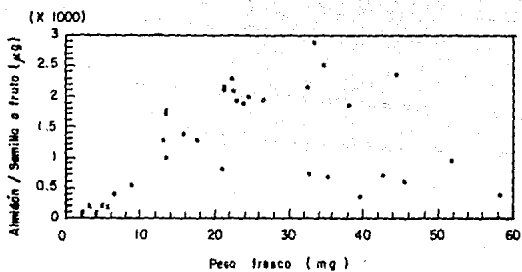


Figura 17. A.- Cantidad de almidón con respecto al peso fresco en frutos y semillas de Ipomoea purpurea cosecha de Noviembre. Los gránulos de almidón se extrajeron en una sol. de acida de sodio 0.02%, se filtró el material por una malla de 100  $\mu$ m y se extrajeron los lípidos mediante hexano. frutos (x-x), semillas (o-o). B.- Suavización del patrón de comportamiento de la cantidad de almidón en las semillas de Ipomoea purpurea.

A



B

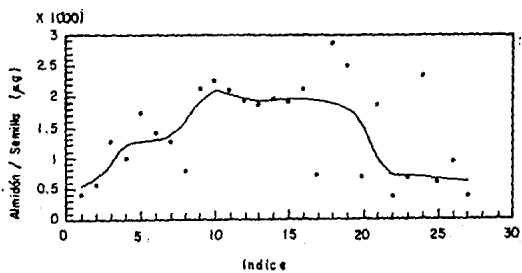


Figura 18. A.- Proporción de almidón con respecto al incremento peso fresco en frutos y semillas de Ipomoea purpurea cosecha de Noviembre. Los gránulos de almidón se extrajeron en una sol. de azida de sodio 0.02%, se filtró el material por una malla de 100  $\mu\text{m}$  y se extrajeron los lípidos mediante hexano. frutos (x-x), semillas (o-o). B.- Suavización del patrón de la proporción de almidón en semillas de Ipomoea purpurea.

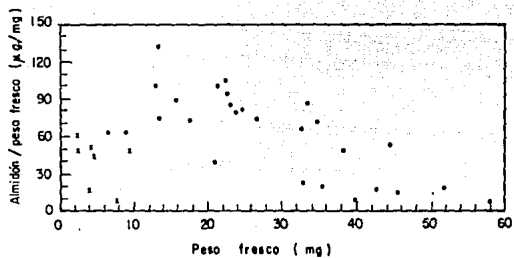
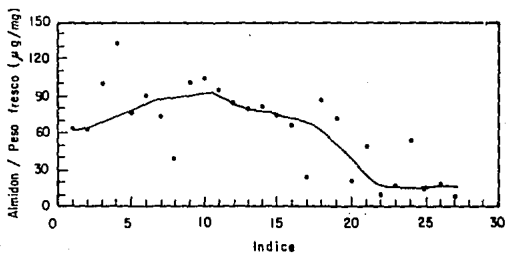
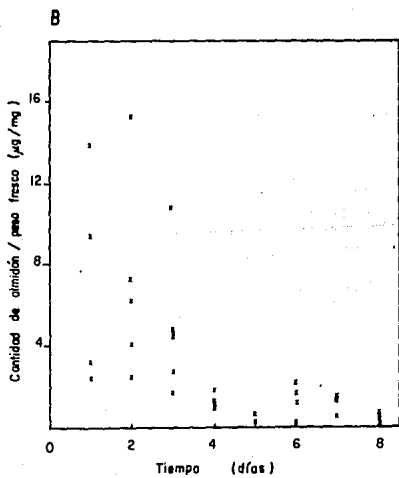
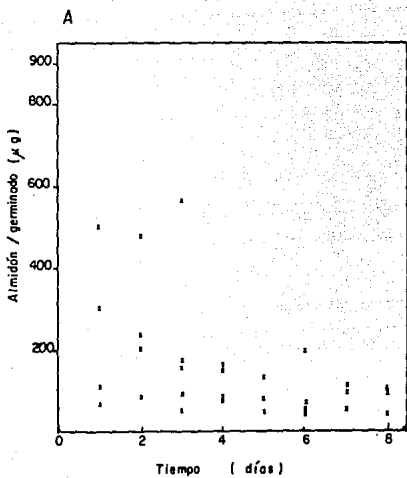
**A****B**

Figura 19.- Cantidad de almidón durante los primeros días de imbibición en plántulas de Ipomoea purpurea. Los gránulos de almidón se extrajeron en una sol. de azida de sodio 0.02%, se filtró el material por una malla de 100  $\mu$ m y se extrajeron los lípidos mediante hexano. A.- Cantidad de almidón durante el desarrollo. B.- Proporción de almidón con respecto al peso fresco a lo largo del tiempo de germinación.





F.- Cuantificación del almidón de la fracción enriquecida de los frutos y las semillas de Ipomoea nil.

Como ya se mencionó en la obtención del material biológico, los frutos de Ipomoea nil se colectaron a la orilla de la laguna de Xel-Ha en el Estado de Quintana Roo, siendo esta una planta silvestre, colectada en el campo, por lo que se consideró el peso fresco como un parámetro de su desarrollo.

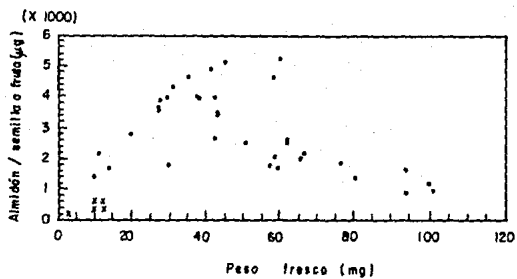
Los valores de la cuantificación del almidón de I. nil indican que para los frutos que presentan pesos frescos menores a 12 mg, la cantidad de almidón es de 200 a 400 ug (Fig. 20a).

Por otra parte para las semillas se observa que a partir de los 10 mg de peso fresco, la cantidad de almidón se incrementa, alcanzando su valor máximo entre los 30 y los 45 mg, iniciándose un decremento en la cantidad de almidón a medida que aumenta el peso fresco de la semilla, que tiende a estabilizarse cuando la semilla alcanza un peso de 100 mg (Fig. 20a). Cuando aplicamos el método de la suavización, en estos datos (Fig. 20b), se observa que se presentan dos fases, la primera ascendente, en la que la cantidad de almidón se incrementa, hasta alcanzar un valor máximo, iniciándose a partir de este valor la segunda fase en la que la cantidad de almidón decrece.

Si se toma la proporción de almidón en relación al peso fresco se tiene que en los frutos, conforme el peso fresco aumenta, la proporción de almidón se incrementa y, para las semillas, el valor máximo se presenta entre los 19 y los 31 mg de peso fresco (Fig. 21).

Figura 20. A.- Cantidad de almidón con respecto al peso fresco en frutos y semillas de Ipomoea nil. Los gránulos de almidón se extrajeron en una sol. de azida de sodio 0.02%, se filtro el material por una malla de 100  $\mu\text{m}$  y se extrajeron los lípidos mediante hexano. frutos (x-x), semillas (o-o). B.- Suavización del patrón de comportamiento de la cantidad de almidón en las semillas de Ipomoea nil.

A



B

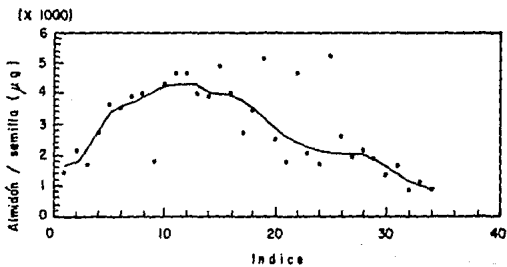
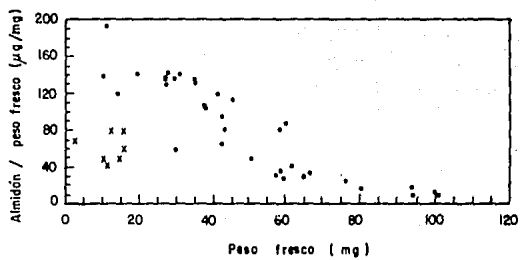


Figura 21.- Proporción de almidón con respecto al incremento peso fresco en frutos y semillas de Ipomoea nil frutos (x-x), semillas (o-o).



G.- Espectros de absorción de los extractos enriquecidos de almidón.

Se obtuvieron los espectros de absorción de los extractos enriquecidos de los frutos, semillas en desarrollo y plántulas de I. purpurea y de los frutos y semillas en desarrollo de I. nil, los cuales se compararon con los espectros de absorción del galactomanano y el almidón soluble para análisis de Merck. (Fig. 22).

Al graficar los espectros de absorción del almidón soluble para análisis de Merck y el galactomanano que se usaron como control observamos que para el almidón, conforme se incrementa la longitud de onda, la absorción se incrementa hasta 560 nm en los que presenta su máximo, iniciándose a partir de este valor un decremento en la absorción conforme aumenta la longitud de onda (Fig. 22a). Por otro lado, el espectro de absorción del galactomanano presenta su valor máximo de absorción en los 430 nm, tendiendo este valor a ser mínimo en longitudes de onda mayores a 550 nm (Fig. 22a).

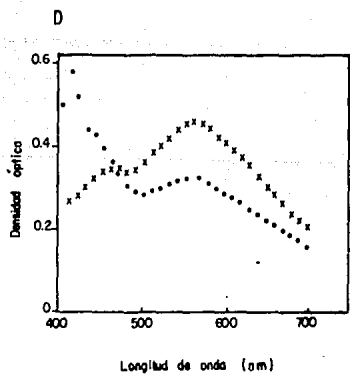
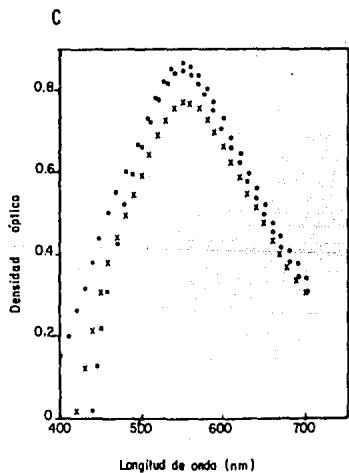
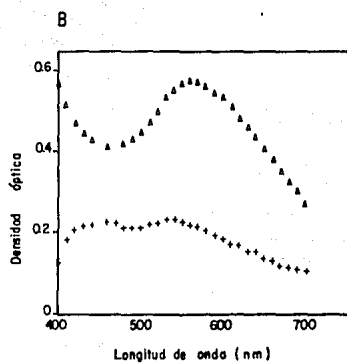
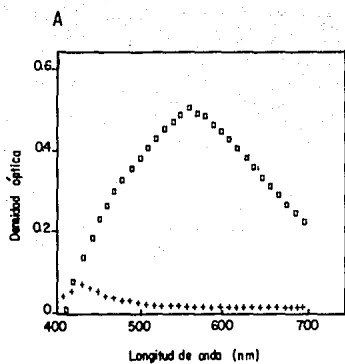
Cuando graficamos los espectros de absorción de I. purpurea observamos que, para los frutos, se presenta un mínimo a 470 nm y conforme decrece la longitud de onda aumenta la absorción. A partir de los 470 nm y conforme se incrementa la longitud de onda, la absorción aumenta hasta 560 nm, en donde se presenta su máximo, decreciendo a partir de este valor (Fig. 22b). En cuanto a la semillas en desarrollo, 12,

15 y 18 días, en general presentan un patrón similar, alcanzando su máxima absorción en los 550 nm y presentándose diferencias entre las muestras en longitudes de onda menores a 450 nm. (Fig. 22c). Para el extracto de almidón de la plántula, 8 días de imbibición, se observa un hombro a los 430 nm y un máximo a los 460 nm, decreciendo a partir de este valor hasta los 490 nm en que inicia un aumento hasta los 550 nm en los que se presenta su máximo de absorción (Fig. 22b).

Por otra parte, al graficar los espectros de I. nil observamos para los frutos un mínimo a 500 nm y conforme decrece la longitud de onda, la absorción se incrementa. A partir de los 500 nm y conforme se incrementa la longitud de onda, la absorción se incrementa hasta alcanzar su máximo a 550 nm (Fig. 22d). Para las semillas en desarrollo a 460 nm se forma un hombro, y a partir de 480 nm la absorción se incrementa hasta los 560 nm, en los que se alcanza el máximo (Fig. 22d).



Figura 22.- Comparación de los espectros de absorción del material biológico de plantas de Ipomoea purpurea e Ipomoea nil, con los espectros del galactomanano y almidón soluble para análisis de Merck. Las muestras utilizadas son las mismas a las que se les cuantifico la cantidad de almidón. A.- Galactomanano, (+-+), almidón soluble para análisis de Merck (▲-▲). B.- Ipomoea purpurea: fruto (▲-▲), plántula (8 días de imbibición) (+-+). C.- Semillas en desarrollo de Ipomoea purpurea 12 (●-●), 15 (x-x) y 18 días (o-o). D.- Ipomoea nil: fruto (●-●), semillas en desarrollo (x-x).



## VIII DISCUSION

Con base en los resultados que se obtuvieron al comparar las densidades ópticas de las curvas patrón de almidón comercial antes y después de aplicar la técnica de extracción y al analizar las pendientes de las curvas del almidón para análisis de Merck y el almidón comercial de papa, se obtiene un valor semejante, lo que indirectamente nos dice que ambos tienen la misma afinidad para unir al ion  $I^{5-}$ , y si cantidades iguales de ambos almidones unen la misma cantidad de yodo, se puede afirmar que lo que se pierde al aplicar la técnica de extracción es almidón. Además de que la forma en que realizamos la técnica es aceptable, lo que se ve confirmado por el alto valor de porcentaje de recuperación del peso del almidón control ( $89.16 \pm 2.20 \%$ ).

Al comparar los espectros de absorción de I. purpurea con los espectros del almidón soluble para análisis de Merck y el galactomanano, observamos que para los frutos la interferencia de polisacáridos es muy notoria en longitudes de onda menores a 470 nm, esto se explica porque la cantidad de material que forma las paredes celulares es alta ya que se trabajó con el fruto completo. En las semillas en desarrollo en general, el comportamiento es similar al del almidón control, en longitudes de onda mayores a 450 nm, presentándose diferencias en la zona de 400 nm, principalmente entre las semillas de 12 y 18 días de desarrollo. Estas diferen-

cias se atribuyen a los polisacáridos que forman las paredes de las células y que se presentan en cantidades diferentes dependiendo del tiempo de desarrollo de la semilla. Para las plántulas, observamos que alcanzan un hombro en los 430 nm, similar al del galactomanano, pero conforme aumenta la longitud de onda, su patrón es similar al del almidón control, lo que significa que los materiales copurificados no interfieren cuando realizamos la cuantificación del almidón.

Por otro lado las muestras de I. nil, tienen un patrón similar al de frutos y semillas de I. purpurea siendo muy notorio el hombro que se presenta a 460 nm en el espectro de las semillas, lo que atribuimos a que el tamaño de las semillas de I. nil, es mayor que el de las de I. purpurea, con una mayor cantidad de polisacáridos de las paredes.

Al determinar la absorbancia de nuestras muestras a 620 nm evitamos que los resultados se vean afectados por la presencia de materiales que acompañen al almidón contenido en los extractos ya que se está eliminando su probable interferencia.

El modelo matemático que se obtiene al relacionar peso fresco v.s. tiempo de desarrollo cumple con los supuestos del modelo de regresión clásico; no hay correlación entre los miembros de una serie de observaciones ordenadas en el tiempo o en el espacio; la prueba estadística Durbin-Watson resulto no significativa. Además de que la varianza condicional de

los resultados elevados al cuadrado es homoscedástica.

Conforme transcurre el tiempo de desarrollo de las semillas de I. purpurea, el peso fresco se incrementa hasta los 22 días, y apartir de este tiempo tiende a estabilizarse hasta llegar a ser una semilla madura hidratada. Se observa que el cambio en la cantidad de almidón a través del desarrollo en semillas de I. purpurea e I. nil presenta dos fases: una que es durante las primeras etapas del desarrollo y en la que el polisacárido se acumula, y la segunda fase en la que se presenta un rápido decremento en la cantidad del almidón.

Para el material biológico de I. purpurea se presentan estas dos fases, una en la que el almidón se acumula hasta alcanzar un valor máximo, a la cual sigue una fase en la que se da un rápido decremento en la cantidad del polisacárido, para estabilizarse en un valor basal en semilla madura hidratada.

Las semillas de 17, 18 y 19 días de desarrollo, presentan una cantidad menor del polisacárido, que la correspondiente a su tiempo de desarrollo, y por lo tanto no siguen el patrón general (Fig. 13a); al relacionar la cantidad de almidón con el peso fresco de las semillas (Fig. 14a), los puntos que corresponden a estas semillas, entran dentro de la curva, puesto que la cantidad de almidón que presentan corresponde a semillas de pesos frescos que en tiempo de desarrollo es de más de 26 días. Y si conforme transcurre el

tiempo de desarrollo el peso fresco de la semilla se incrementa, podemos decir, que las semillas de 17, 18 y 19 días, que no siguen el patrón general (Fig. 13a), pertenecen a frutos en los que aparentemente el desarrollo de las semillas se aceleró.

Por otra parte, cuando consideramos la proporción entre la cantidad de almidón con respecto al peso fresco, como parámetro de desarrollo (Figs. 15a y 15b), observamos que los puntos que corresponden a semillas cuyo peso fresco es menor a 2 mg, presentan una proporción de almidón mayor a la que corresponde a su peso fresco, lo que se atribuye a que cuando se hizo la disección del fruto, como éste era aun pequeño y no fácil de manipular, al separar la semilla, puede ir acompañada por otro tejido del fruto, el cual también tiene almidón y cuando se cuantificó el polisacárido, la cantidad del carbohidrato fue mayor que la que realmente existía en la semilla.

Cuando comparamos las cosechas de Octubre y Noviembre observamos que los frutos y semillas de la segunda cosecha presentan pesos frescos mayores a los de la primera aunque tienen el mismo tiempo de desarrollo y pertenecen a la misma planta. Observamos también que plantas que en la cosecha de Octubre dieron una gran cantidad de frutos, en la cosecha de Noviembre presentaron un número menor y que la dispersión entre los datos es mayor en la segunda que en la primera cosecha, lo que atribuimos a las condiciones ambientales que

afectan a la planta, ya que como lo menciona Conzatti (1981) en los meses de Septiembre a Octubre el número de frutos es considerable, disminuyendo drásticamente en Noviembre y Diciembre. Además las condiciones ambientales son diferentes en estos meses; se sabe que si la temperatura aumenta, se incrementa la cantidad de materia seca, siendo parte de ésta el almidón y que si la cantidad de irradiación se incrementa, aumenta la cantidad de fotosintetatos por lo que la proporción de nutrientes que se traslocan al fruto es mayor, lo que indirectamente aumenta la cantidad de reservas (Dekhuijzen et al, 1988). Aunado a esto se sabe que en algunas especies, los procesos del desarrollo de las semillas, crecimiento, maduración, viabilidad y deshidratación así como sus controles están regulados por la redistribución de las sustancias de reserva del fruto independientemente de la planta (Fountain et al, 1989). En general el comportamiento es el mismo para las dos cosechas, una primera fase en la que la cantidad de almidón se incrementa alcanzando un valor máximo e iniciándose después un rápido decremento, lo cual se refleja, en el incremento en peso fresco total de la semilla, hasta los 17 días, en los cuales se ha alcanzado el valor máximo en la cantidad de almidón y que a partir de este tiempo la cantidad del polisacárido decrece, pero el peso fresco total de la semilla se incrementa por que el embrión comienza a crecer, con una tendencia del peso fresco total de la semilla a estabilizarse a medida que se convierte en una semilla madura hidratada. Cuando relacionamos nuestros resultados, con los obtenidos por otros miembros del laboratorio, observamos que,

el rápido decremento en la cantidad de almidón coincide con el crecimiento acelerado del embrión y con el incremento en la actividad amilolítica (Díaz-Fontones, 1991; Domínguez-Vergara, 1991), la cual alcanza su máximo, en el periodo en que la cantidad de almidón es mínima, lo que quiere decir que se está degradando el polisacárido. Aunado a ello, en esta etapa del desarrollo de la semilla, el embrión también está creciendo y tiene que hacer uso del material de reserva para su desarrollo tendiendo después a estabilizarse cuando la semilla ha completado su desarrollo.

Al hacer la comparación entre las gráficas de cantidad de almidón versus tiempo y cantidad de almidón versus peso fresco (Figs. 13a, 14a, 16 y 17a), observamos que las curvas, en las que se utiliza al peso fresco como parámetro de desarrollo, muestran un patrón más definido, ajustándose mejor los datos a esta curva y que la dispersión es menor, que en las gráficas de tiempo.

Cuando comparamos los resultados que se obtuvieron para I. nil con los de I. purpurea observamos que el patrón general es similar en ambas plantas, presentando una fase de acumulación del almidón en la que la cantidad de este polisacárido se incrementa hasta alcanzar su máximo valor aproximadamente a la mitad del peso fresco que alcanza la semilla cuando ha completado su desarrollo y que a partir de este valor se inicia un decremento en la cantidad de almidón hasta la semilla madura hidratada, alcanzando valores en las canti-



dades de almidón mayores que los de I. purpurea lo que se debe a que el tamaño y el peso fresco de las semillas de I. nil es mayor que las de la primera planta. Cuando hacemos la comparación de proporción de la cantidad de almidón con respecto al peso fresco, las proporciones para ambas plantas son similares.

En cuanto a los resultados que se obtuvieron para las plántulas de I. purpurea, en 8 diferentes días de iniciada la imbibición, observamos que durante los primeros días se presenta una cantidad reminiscente de almidón, la cual es similar a la que se encuentra en semillas maduras hidratadas, y que conforme transcurre el tiempo de germinación se consume, tendiendo a ser una cantidad mínima. También se presentan puntos que no siguen el patrón general principalmente durante los días 2, 3 y 6 en los cuales hay plántulas en las que el peso fresco que presentan no corresponde al tiempo de germinación que tienen y por lo mismo la cantidad de almidón tampoco. Esto se atribuye a que el peso y tamaño de las semillas que se pusieron a germinar no era el mismo para todas, considerando que el peso de la semilla se relaciona con el tamaño del embrión, ya que una de las semillas del fruto, la líder, es la que marca los cambios en los estímulos durante el desarrollo (Dekhuijzen, 1988); esta semilla contará con una mayor cantidad de nutrientes durante su desarrollo, de los que hará uso para el crecimiento del embrión y éste último estará mejor preparado para responder

al estímulo de la germinación, lo que pudo haber influido en los resultados. Aunado a esto la germinación en estas semillas no es sincrónica, por lo que nuestros resultados se vieron afectados por este factor.

## IX CONCLUSIONES

1.- La técnica de extracción de almidón implementada en el Laboratorio, tiene una alta eficiencia de extracción, en la que las impurezas copurificadas no interfiere con el método de cuantificación del almidón.

2.- El modelo matemático propuesto para relacionar peso fresco v.s. tiempo de desarrollo, es una herramienta útil en el momento de determinar el tiempo de desarrollo de una semilla conociendo su peso. Este modelo tiene características estadísticas que lo hacen confiable.

3.- El almidón es una sustancia de reserva temporal en las semillas de desarrollo, observándose:

a) En las semillas de I. purpurea e I. nil el patrón en la cantidad de almidón presenta dos fases: la primera en la que el polisacárido se acumula, alcanzando su valor máximo cuando la semilla alcanza la mitad del peso fresco de la semilla madura hidratada. La segunda fase en la que la cantidad de almidón decrece, tendiendo a estabilizarse cuando la semilla se ha desarrollado completamente.

b) Aunque la cantidad del almidón es diferente en las semillas de las dos especies, la relación almidón/peso fresco es la misma en ambas.

c) El decremento en la cantidad de almidón coincide con la expansión rápida del embrión, por lo que debe de ser utilizado durante este proceso.

d) Las diferencias observadas que se presentan entre las cosechas de Octubre y Noviembre pueden deberse a las condiciones ambientales que influyen en la deposición de sustancias de reserva en la semilla.

4.- Durante las primeras fases postimbibición, no hay síntesis de novo del almidón; se utilizó en esta etapa el remanente que existía en la semilla madura deshidratada.

5.- El peso fresco es un mejor parámetro de desarrollo de las semillas, que el tiempo postantesis, debido a su menor dispersión.

## X , B I B L I O G R A F I A

Agundis, M. (1984). Logros y aportaciones de la investigación agrícola en el combate de la maleza. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. México.

Austin, D., R. Pedraza (1983) Los géneros de Convolvulaceas en México. Bol. Soc. Bot. México No. 44.

Akazawa, T. Polysaccharides. En: Plant Biochemistry. Bonner, J. Eds. 3rd. Ed. Academic Press. (1976). New York. pp:381-404.

Balls, A., M. Walden, R. Thompson. (1948). A crystalline amylose from sweet potato. J. Biol. Chem. 173:9-19.

Banks, W., D. Muir. Structure and chemistry of the starch granule. En: The Biochemistry of plants Vol. 3. J. Press ed. Academic Press New York. (1980). pp:321-369.

Bewley, J. (1978) Mobilization of reserves. En: Physiology and Biochemistry of seeds in relation to germination. Ed. Bewley, J., M. Black, Springer Verlag, Berlin Cap. 6.

Biliaderis, C., P. Grant, J. Vose. (1979). Molecular weight distribution of legume starches by gel chromatography. *Cereal Chem.* 56:475-479.

Biliaderis, C., P. Grant, J. Vose. (1981). Structural characterization of legume starches. I. Studies on amylose, amylopectin, and Beta-limitdextrins. *Cereal Chem.* 58 (6):496-502.

Brink, R., D. Cooper. (1947). The endosperm in seed development. *Bot. Rev.* 13: 423-541.

Carballo, C. (1966). El cultivo del maíz en el Bajío y zonas similares. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. S. A. G. Circular CIAB 8:3-20.

Chapman, G., J. Pallas, J. Mendicino. (1972). The hydrolysis of maltodextrins by a Beta-amylase isolated from leaves of Vicia faba. *Biochem. Biophys. Acta* 276:491-507.

Conzatti, C., L. Smith. *Flora sinoptica mexicana*. Tercera Ed. IPN (1981) México pp 66-77.

Crocker, W., L. Barton. (1953). *Physiology of seeds. An introduction to the experimental study of seed and germination problems.* Vol. 29. Waltham, Mass., Chronica Botanica Company.

Daussant, J., P. Corvazier. (1970). Biosynthesis and modification of a and B amylase in germinating wheat seeds. FEBS Lett. 7:191-194.

Dekhuijzen, H., J. Van Hattum, D. Verkerke. (1988). Effect of temperature on growth of Vicia faba cotyledons in vitro. Plant Science, 54: 223-229.

Díaz-Fontones, D., J. Márquez. M. Domínguez, H. Becerril. (1991). Utilización de los carbohidratos de reserva por las semillas de angiospermas durante la germinación. ContactoS. Nueva Epoca Núm. 3:50-56.

Domínguez-Vergara, L. (1991). Actividad enzimática de la degradación del almidón durante el desarrollo de la semilla de Ipomoea purpurea. Tesis Licenciatura Fac. Ciencias U. N. A. M.

Dore, W. (1956). Some grass genera with liquid endosperm. Torrey Bot. Club Bul. 83: 335-337.

Eaton, H., J. MacLeod (1946) The weeds of Ontario. Ontario Department of Agriculture. Statistics and Publications Branch. Toronto, Ontario Bulletin. 409. 129 pp.

Eliasson, A. (1988). Physical and chemical characteristics of Legume starches. Atlas of Science Animal and Plant Science. 1(1):89-94.

Enari, T., T. Sopenen. (1986). Mobilization of endospermal reserves during the germination of barley. J. Ints. Brem. 92:25-31.

Esau, K. Anatomy of seeds plants 2nd. ed. John Wiley and Sons eds. New York. (1977). 550 pp.

Font Quer, P. Diccionario de Botánica. Ed. Labor, S. A. (1965). Barcelona. 1244 pp.

Fountain, D., H. Outred, J. Holdsworth, R. Thomas. (1989). Seed Development in Phaseolus vulgaris L. cv Seminole. Plant Physiol. 89:333-340.

French, D. Organization of starches granules. En: Starch chemistry and technology. 2nd Ed. Whistler, L., J. Be Miller, E. Pashall Eds. Academic Press (1984) Orlando Florida. pp:184-247.

Frey-Wyssling, A., K. Muhlethaler (1965) Ultrastructural plant chytology. Elsevier, Amsterdam. pp:123-139.



Gertler, A., Y. Birk. (1965). Purification and characterization of a B-amylase from soya bean. Biochem. J. 95:621-627.

Greenwood, C., J. Thomson. (1962). Physicochemical studies on starches. Part XXIV The fractionation and characterization of starches of various Plants origins. J. Chem. Soc. 222-229.

Greenwood, C., A. MacGregor, E. Milne. (1965). The amylase from brood beans. Purification and propieties. Arch. Biochem. 112:459-464.

Gujarati, D. Econometría Básica. Mc Graw Hill. (1989). México. 345 pp.

Hernández, A. (1982). Logros y aportaciones de la investigación agrícola en los cultivos de arroz. INIA. México. co.

Hoover, R., F. Sosulski. (1985). Studies on the functional characteristics and digestibility of starches from Phaseolus vulgaris biotypes. Starch Staerke. 37:181-91.

IBPG (International Board Plant Genetic Resources). (1981). Genetic Resources of Sweet Potato. IBPGR, Secretariat, Roma. 20 pp.

Jensen, W. (1973). Fertilisation in flowering plants. *BioScience*. 23:21-27.

Juliano, B. (1971). A simplified assay for milled-rice amylose. *Cereal Sci. Today*. 16(10):334.

King, L. Weeds of the world. Biology and control. Leonard Hill Books. (1966). London 526 pp.

Knutson, C., J. Cluskey, F. Dintzis. (1982). Properties of amylose-iodine complexes prepared in the presence of excess iodine. *Carbohydrate Research*. 101:117-128.

Laundry, L., D. Smith. (1988). Characterization of starch produce by suspension cell cultures of Indica rice (Oryza sativa L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 5:23-32.

Lehninger, A. Principios de Bioquímica. Omega. Barcelona, España. (1984). Cap. 11.

López-Curto, M. (1987). Estudio del ciclo de vida y del desarrollo de la semilla de Ipomoea X leucantha (Convolvulaceae) contaminante del arroz comercial. Tesis Licenciatura. Fac. Ciencias. U.N.A.M.

López-Curto, M., Márquez, J., Laguna, G., Ponce, M. (1990). Ciclo de vida y desarrollo de la semilla de Ipomoea X leucantha (Convolvulaceae) arvense del arroz. *Phyton*. 51 (1): 17-24.

Lotka, A. (1956). Elements of mathematical biology. Una bridged republication of: Elements physical biology New York: Dover. pp:23-42.

MacGregor, A. (1979). Isolation of large and small granules of barley starch and a study of factors influencing the adsorption of barley malt a amilase by the granules. *Cereal Chem.* 56(5):430-434.

Manners, D. Some aspects of the enzymic degradation of starch. En: *Plant Carbohydrate Biochemistry* Ed. J. B. Pridham. Academic Press. (1974). New York. Cap. 8.

Martin, A. (1946). The comparative internal morphology of seeds. *Amer. Midl. Nat.* 36:513-660.

Martínez, M. Plantas medicinales de México. 5a Edición. Editorial Botas, México D. F. (1969). 656 pp.

Matuda, E. (1963). El género Ipomoea en México. *An. Inst. Biol. México.* 34: 85-145

- Matuda, E. (1964). El género Ipomoea en México II. An. Inst. Biol. México. 35 (1-2).
- Matuda, E. (1966). Las Convolvulaceae del Estado de México. Gobierno del Estado de México, Toluca, México. 56 pp.
- Maynard, S. Ideas matemáticas en Biología. CECSA. (1989). México. 354 pp.
- Meier, H. (1958). On the structure of cell wall and cell wall mannans from ivory nuts and from dates. Biochem. Biophys. Acta 28:229-240.
- Meyer, C. (1958). Cell patterns in early embryogeny of the McIntosh apple. Amer. J. Bot. 45:341-349.
- Miller, E. (1958). The accumulation of carbohydrates by seeds on fruits. Handb. der Pflanzenphysiol. 6:871-880.
- Muenschler, W. Weeds. 2nd Ed. The Mac Millan Company. (1955). New York. 560 pp.
- Müller, D. (1943). Tote Speichergewebe in lebenden Samen. Planta. 33:588-599.

Okamoto, K., T. Akazawa. (1979). Enzymic mechanisms of starch breakdown in Germinating rice seeds. *Plant Physiol.* 63:326-340.

Okita, T., E. Greenberg, D. Kuhn, J. Preiss. (1979). Subcellular localization of the starch degradative and biosynthetic enzymes of spinach leaves. *Plant Physiol.* 64:187-192.

Ordetex, S., A. Zozaya, M. Franco. (1976). La flora apícola nacional. Dirección General de Apicultura y especies menores. SARH. México, D. F. 91 pp.

Pedraza, R. (1983). Estudio palinológico de la Familia Convolvulaceae en México I Géneros Ipomoea L. y Turbina Raf. *Biotica.* 8(4):387-411.

Ponce-Salazar, M., J. Márquez-Guzmán, A. Brechu-Franco, G. Laguna-Hernández. (1990). Desarrollo e Histoquímica de la cubierta seminal de Ipomoea purpurea (L.) Roth (Convolvulaceae) y su relación con la impermeabilidad al agua. *Phyton.* 51(1):5-12.

Pongprayoon, U., L. Bohlin, P. Soonthornsaratune, S. Wasuwat. (1991). Antiinflammatory Activity of Ipomoea pes-caprae (L.) R. Br. *Phytotherapy research* 5(2):41-44.

Preiss, J. (1982). Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. Ann. Rev. Plant Physiol. 33:431-454.

Preiss, J., C. Levi. Starches biosynthesis and degradation. En: The biochemistry plants. J. Preiss Ed. Vol. 3. Academic Press. (1980). New York. pp:371-423.

Reeder, J. (1957). The embryo in grass systematics. Amer. J. Bot. 44:756-768.

Rees, T. Integration of pathways of synthesis and degradation of hexoses phosphates. En: The biochemistry plants. J. Preiss Ed. Vol. 3. Academic Press. (1980). New York. pp:1-42.

Robbins, W., H. Borthwick. (1925). Development of the seed of Asparagus officinalis. Bot. Gaz. 80:426-438.

Robertis, E. Biología Celular y Molecular. Undecima edición. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina. (1986). Cap. 12.

Rundle, R., L. Daasch, D. French. (1944). En: Banks, Structure and Chemistry of the starch granule. En: The Biochemistry of plants. J. Preiss ed. Vol. 3. Academic Press. New York. (1980). pp:321-369.

Schultes, G. Plants of the Gods. The origin of hallucinogenic plants. Mac. Millan Co. New York. (1981). 192 p.

Souza, N., M. Suárez, M. Barrera. (1981). Plantas melíferas y políníferas de Yucatán. Fondo Editorial de Yucatán, Mérida, Yucatán. 59 pp.

Sopanen, T., Ch. Lauriere. (1989). Release and activity of bound B-amylase in a germinating barley grain. Plant Physiol. 89:244-249.

Subcomité de plantas nocivas. Comité sobre plagas de plantas y animales. Consejo de Agricultura. Consejo Nacional de Investigación. National Academic of Sciences. Plantas Nocivas y como combatirlas. Control de plagas de plantas y animales. Vol. II. Limusa. (1982). México. Cap. 2.

Schoch, T. (1945). The fractionation of Starch. Advan. Carbohyd. Chem. 1:247-277.

Suda, M., T. Watanabe, M. Kobayashi, K. Matsuda. (1986). Changes in starch content and related enzyme activities during the growth of germination soybeans. Agric. Biol. Chem. 50(12):3195-3196.

Swain, R., E. Dekker. (1966). Seed germination studies II. Pathways for starch degradation in germinating pea seedling. *Biochem. Biophys. Acta* 122:87-100.

Takahashi, S., P. Seib. (1988). Plaste and gel properties of prime corn and wheat starches without native lipids. *Cereal Chemistry* 65(6):474-483.

Teitelbaum, R., S. Rubi, T. Marks. (1978). En: Banks, Structure and chemistry of the starch granule. En: The Biochemistry of plants. J. Preiss ed. Vol. 3. Academic Press New York. (1980). pp:321-369.

Thoma, J., J. Spadlin, S. Dygert. (1971). Plant and animal amylases. En: Boyer, P. The enzymes. Vol:3. Academic Press. New York. pp:115-189.

Tipples, K., R. Tkachuk. (1965). Wheat B-amylase. I. Isolation. *Cereal Chem.* 42:111-124.

Tukey, J. Exploratory data analysis. Addison-Wesley Publishing Company. Reading, Massachusetts. (1977). 688 pp.

Vélez, I. Plantas indeseables en cultivos tropicales. Editorial Universitaria. (1950). Río Piedras, Puerto Rico. 459 pp.



Verdcourt, B. (1970). Convolvulaceae morning glory family. En: Flowering Plant of the World. Messinger, E. Heartside Pub. New York. pp:142-158.

Villegas, M. Malezas de la Cuenca de México. Especies Arvenses. Instituto de Ecología. Museo de Historia Natural de la Ciudad de México. Publicación 5. (1979). México. 52 pp.

Wardlaw, C. Embryogenesis in plants. Jhon Wiley and Sons. (1955). New York. 213 pp.