

2. 11. 96



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**VARIACIONES EN EL CONTENIDO DE
ACIDO INDOLACETICO EN GRANOS DE
MAIZ DURANTE LA MADURACION**

T E S I S

REBECA RODRIGUEZ CORNEJO

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

1984



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

- I INTRODUCCION
- II ANTECEDENTES :
 - 1.- EL PROBLEMA
 - 2.- GERMINACION Y LATENCIA
 - 3.- HORMONAS EN LA GERMINACION
 - 4.- AUXINAS
 - 5.- GERMINACION PREMATURA
 - 6.- METODOS PARA DETERMINAR ACIDO INDOLACETICO
- III OBJETIVO
- IV MATERIALES Y METODOS
- V RESULTADOS Y DISCUSION
- VI RESUMEN Y CONCLUSIONES
- VII BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La germinación prematura de maíz es un problema que se ha ido incrementando en México en los últimos años, y que causa pérdidas muy importantes de este grano, especialmente en Puebla y Tlaxcala.

Para conocer las causas y el mecanismo mediante el cual los granos de maíz germinan aún antes de la cosecha, y para sugerir algunas soluciones al problema, se formó en 1980 un grupo interdisciplinario de estudio de la germinación prematura.

Uno de los aspectos importantes del problema es el estudio del papel de las hormonas de crecimiento en la germinación prematura y en este trabajo se estudió la variación del contenido de ácido indolacético durante la maduración de semillas de maíz de tres variedades: el maíz criollo que se siembra en el área que presenta mayor incidencia del problema, la variedad H-32 que se había descrito como muy susceptible a la germinación y la variedad H-139 que había presentado mayor resistencia. Otros aspectos del problema han sido estudiados en estas mismas variedades por los diferentes miembros del grupo interdisciplinario.

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo indican que en 1982 el contenido de ácido indolacético de las tres variedades de maíz estudiadas cambió de una manera normal (1), es decir, es elevado en estado "lechoso" y disminuye drásticamente al llegar el maíz al estado "masoso".

ANTECEDENTES

EL PROBLEMA

En los estados de Puebla y Tlaxcala, en los últimos años, se ha incrementado el fenómeno de germinación prematura de semillas de maíz (viviparidad). En 1977 el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) tuvo conocimiento del fenómeno a través de un grupo de agricultores de Tlacamilco, Puebla, quienes llevaron mazorcas podridas con granos germinados, antes de su madurez fisiológica. Se localizó la zona donde se presenta el fenómeno, encontrándose que coincide con la parte alta del volcán de la Malinche, y se concentra en San Antonio Tlacamilco. En los trabajos iniciales se estudio la relación entre la incidencia de la viviparidad y la variedad de maíz. Félix y Romero (2) estudiaron la capacidad del hongo *Fusarium moniliforme* de inducir la germinación prematura, en esas investigaciones se aisló al microorganismo del material vegetal y se probó su capacidad para inducir germinación prematura inoculando diferentes concentraciones del hongo tanto al suelo como a elotes bajo condiciones de laboratorio, invernadero y campo y no se logró la inducción de la germinación prematura. También se investigó sobre los efectos de diferentes fuentes y niveles de nitrógeno sobre la viviparidad. Estos estudios, que no proporcionaron datos concluyentes, condujeron a una primera reunión de discusión del problema el 9 de septiembre de 1980 con la participación de personal científico del INIA, Colegio de Posgraduados y UNAM; se expusieron y discutieron diversos aspectos de la germinación prematura de semillas, y pudo apreciarse una amplia gama de posibilidades de investigaciones en distintas especialidades científicas que contribuirían al

conocimiento y eventualmente a la solución del problema. Se acordó que se obtendría la información que permitiese demostrar si el problema era o no causado por agentes fitopatógenos y que debían intensificarse las investigaciones de aspectos bioquímicos (enzimas, inhibidores, hormonas, etc.) y de índole ecológica que pudieran estar relacionados con la viviparidad.

En el Campo Experimental del INIA en Tecamachalco el grupo interdisciplinario pudo observar los distintos aspectos de la viviparidad en condiciones de campo y se consideró conveniente utilizar material del Campo Experimental para los diferentes proyectos de investigación, por lo que se acordó que el INIA proporcionara muestras bajo programación para permitir la observación secuencial del fenómeno en estudio hasta la cosecha de la planta (2).

GERMINACION Y LATENCIA

La germinación y la latencia son dos procesos que están íntimamente relacionados. La latencia en la semilla termina cuando empieza la germinación. Latencia es una fase en el ciclo de vida en la que el crecimiento activo está temporalmente suspendido, en esta fase el vegetal muestra una adaptación a condiciones ambientales desfavorables (3).

Hay dos hipótesis sobre el mecanismo de la latencia, una de ellas asume que la regulación de la latencia es hormonal y postula que el crecimiento puede detenerse porque alguna sustancia promotora del crecimiento es deficiente o por la presencia de sustancias activamente inhibitoras; en la otra hipótesis se dice que la causa de la latencia es una

restricción en el intercambio gaseoso. Hay evidencias que sugieren que los altos requerimientos de oxígeno de ciertas semillas se deben a la presencia de inhibidores de la germinación, por lo que se establece un puente entre las dos teorías del mecanismo de la latencia (3).

Se considera como germinación la serie de pasos que ocurren antes de que la radícula atraviese las cubiertas de la semilla (4), siendo éste último el primer signo visible de la germinación (3).

La luz, la temperatura, el agua y la aereación son los factores más importantes que afectan la germinación de las semillas. Hay semillas sobre las que la luz tiene un efecto positivo en la terminación de la latencia por ejemplo *Lactuca sativa*, y hay otras en las que el efecto es contrario como es el caso de *Helleborus niger*. Las temperaturas mínima, óptima y máxima para la germinación también varía de una especie a otra, en general las temperaturas mínimas para la germinación son menores para especies de clima templado que para especies tropicales, por ejemplo *Fagus sylvatica* germinará a temperaturas cercanas a 0 °C. La penetración de agua y oxígeno a las semillas se ve influenciada por sus cubiertas, por ejemplo las semillas de las leguminosas presentan cubiertas tan impermeables al agua que deben pasar por un período en el suelo hasta que sus capas se rompan bajo la acción de los microorganismos del suelo o mecánicamente deben escarificarse; las cubiertas de las semillas de *Avena fatua* interfieren en el intercambio gaseoso, al remover las cubiertas la recaptura de oxígeno por el embrión se incrementa considerablemente (3).

Como las semillas tienen un contenido de agua relativamente bajo necesitan adquirir cantidades considerables de agua antes de que la germinación pueda ocurrir; inicialmente el proceso de recaptura de agua es por imbibición. Las propiedades imbibicionales de las semillas derivan de los materiales coloidales que poseen especialmente proteínas y almidones (3), la imbibición permite la hidratación de los tejidos y la activación de los sistemas metabólicos que propiciarán el crecimiento del embrión (5).

Uno de los cambios más notables que ocurren cuando la semilla está en condiciones favorables para la germinación es un incremento rápido en la respiración. Durante los primeros pasos de la germinación, debido a una restricción en la recaptura de oxígeno por la testa parece predominar la respiración anaeróbica y hay evidencias en chicharo de acumulación de etanol así como de que ocurre glucólisis anaeróbica y fosforilación glucolítica porque se observa la utilización del fosfato inorgánico del medio (3).

Bajo condiciones aeróbicas el ácido pirúvico producido en la glucólisis se oxida a bióxido de carbono y agua a través de la ruta de los ácidos tricarbónicos, y ya que las enzimas involucradas en esta ruta se localizan en la mitocondria, Conn en 1957 hizo preparaciones mitocondriales de semillas germinantes y de semillas secas para ver en ambas la actividad del ciclo de los ácidos tricarbónicos y encontró que en los pasos iniciales de la germinación el ciclo de los ácidos tricarbónicos es inactivo, además las mitocondrias de semillas secas son incapaces de efectuar la fosforilación oxidativa. Otro hallazgo es el hecho de que en semillas se

cas de frijol el ATP está ausente, pero aparece rápidamente después de la imbibición. Lo expuesto indica que la respiración aeróbica se incrementa gradualmente con el progreso de la germinación (3).

La vía de las pentosas que es una ruta alternativa en el metabolismo de carbohidratos se ha demostrado que está presente en semillas de frijol. Aunque la actividad de ciertas enzimas puede ser demostrada en semillas en latencia, en general hay un marcado incremento en la actividad de muchas enzimas durante la germinación. Para algunas enzimas este incremento parece ser debido a su conversión de una forma inactiva a una activa. También hay síntesis de noyo de muchas enzimas como lo demuestran los inhibidores de la síntesis proteica como el cloramfenicol. La estimulación de la formación de amilasa en el endospermo de cebada por el ácido giberélico es un ejemplo de la síntesis de noyo de una enzima durante la germinación (3)

Durante la germinación de granos de cebada los almidones de reserva del endospermo son digeridos bajo la acción de varias amilasas, la alfa amilasa no es activa en granos de cebada en latencia; pero aparece durante la germinación. Haberlandt en 1890 concluyó que la alfa amilasa en el endospermo de cebada que está germinando es secretada por la capa de aleurona.

El hallazgo de Sachs de que la digestión del endospermo no ocurre cuando se remueve el embrión condujo a la hipótesis de que el embrión ejerce su acción a través de la producción de giberelinas, esta hipótesis fue confirmada por Paleg quien estimuló la actividad de alfa amilasa aplicando giberelinas sobre semillas a las que les había removido el embrión,

éste es, además, un ejemplo de control hormonal de la síntesis enzimática. Posteriormente se mostró que la formación de alfa amilasa es inhibida por cicloheximida (por consiguiente requiere síntesis proteica) y por actinomicina D (por consiguiente requiere síntesis de ARN) (3).

Se han observado cambios en el metabolismo de los ácidos nucleicos durante la germinación de las semillas, hay una síntesis activa de ARN y esto aparentemente involucra todas las fracciones de ARN, se observa un incremento rápido de polirribosomas y los experimentos con P^{32} muestran una incorporación a la fracción polirribosomal. Durante la maduración de las semillas todas las fracciones de ARN disminuyen marcadamente y los ribosomas desaparecen casi completamente en el endospermo, pero durante los estadios tempranos de la germinación estos procesos son revertidos (3).

Resumiendo: al penetrar agua a la semilla se desencadenan los procesos bioquímicos que cubrirán las necesidades del embrión: activación de enzimas que metabolizarán sustratos almacenados en el endospermo; síntesis proteica para cubrir los requerimientos metabólicos y síntesis de ácidos nucleicos para la expresión genética del embrión.

HORMONAS EN LA GERMINACION

Se ha estudiado el papel de las cinco clases de hormonas vegetales: auxinas, giberelinas, ácido abscísico, citocininas y etileno (6) en la germinación de semillas.

En numerosos estudios se ha demostrado que las giberelinas juegan un papel muy importante, por ejemplo, Fountain (7) imbibió un grupo de semillas sobre papel filtro en presencia

de giberelinas y otro grupo en presencia de agua y al comparar el tiempo de germinación de ambos observó que las giberelinas disminuyeron este período, con lo que pudo comprobar el efecto inductor de las giberelinas sobre la germinación. Paleg (8) determinó un incremento tanto en la actividad de alfa amilasa como en el consumo de oxígeno y producción de azúcares reductores por la acción de las giberelinas. Siendo la alfa amilasa una proteína los estudios de las giberelinas se enfocaron hacia la síntesis de proteínas, y para dar sólo algunos ejemplos puede mencionarse los trabajos de Fountain (7) quien comprobó la acción de las giberelinas sobre la síntesis proteica al determinar mayor número de polirribosomas cuando imbibió con giberelinas que cuando sólo usó agua, así también en sus experimentos de incorporación de leucina radioactiva, los granos tratados con giberelinas presentaron aproximadamente el doble de la radioactividad específica que los imbibidos con agua; por otro lado, los estudios de Jacobsen (9) se refieren a la caracterización de alfa amilasas sintetizadas en respuesta a la adición de giberelinas, Upanhyaya (10) en los primeros días de la germinación detectó una disminución de deshidrogenasas pudiendo inferir que en los pasos iniciales de la germinación es activa la vía de las pentosas.

Coleniowski (11) estudio el efecto del ácido abscísico (ABA) sobre la germinación, adicionando concentraciones de ABA (1×10^{-6} M — 2×10^{-4} M), observó una acción inhibidora del ABA sobre el proceso. En sus estudios sobre el ABA Glinka (12) determinó que inhibe la síntesis proteica, por su parte Fountain (7) encontró que el ABA retarda la sín

tesis proteíca, porque actúa antes de que los granos estén completamente hidratados y la teoría de Schopfer (13) es que el ABA controla la recaptura de agua en los tejidos embrionarios más que controlar la síntesis de ácidos nucleicos o proteínas, en sus estudios incubó semillas en ABA durante tres días, luego las secó y las imbibió en ausencia de ABA siendo las semillas capaces de germinar.

Por lo que respecta a la acción de las citocininas, Dunlap (14) y Fountain (7) con sus estudios pusieron de manifiesto la acción inductora de las citocininas sobre la germinación al revertir la acción inhibitoria impuesta por el ABA.

El papel inductor del etileno sobre la germinación fue demostrado por Ketring (15) quien utilizó para sus estudios dos grupos de semillas, a uno de ellos le aplicó etileno y al comparar ambos grupos encontró una mayor germinación en las semillas tratadas con etileno. En su investigación sobre la función del etileno Dunlap (14) impuso la latencia de semillas con ácido abscísico o manitol y logró el proceso germinativo con etileno pero en presencia de giberelinas por lo que afirma que la función inductora del etileno sobre la germinación es dependiente de la presencia de giberelinas, más tarde Eastwell (16) afirmó que las paredes celulares masivas de las capas de aleurona actúan como una barrera para la liberación de proteínas al medio, por su parte Ho (17) observó que el etileno reduce significativamente la cantidad de alfa amilasa atrapada por las paredes celulares de la capa de aleurona.

AUXINAS

El papel de las auxinas en la germinación es aún desconocido (18). Los estudios de aplicación de auxinas sobre semillas para la observación de su efecto sobre el proceso no han aclarado su papel sobre esta función vegetal, en general se ha encontrado que la aplicación exógena de auxina no tiene efecto sobre la germinación (18,19). Tilberg (18) propuso que las semillas poseen un nivel de auxina endógeno óptimo para la germinación, en su análisis del contenido del ácido indolacético endógeno durante la germinación de semillas de maíz, encontró que el nivel de la hormona asciende rápidamente durante las primeras cuatro horas de remojadas las semillas, que a las treinta y seis horas alcanza un máximo y entonces disminuye. La presencia de ácido indolacético en las semillas y el hecho de que su contenido se incrementa en respuesta a un cambio de condiciones que favorecen la germinación indican que el ácido indolacético es importante en el proceso germinativo.

Otros estudios demuestran también la importancia del ácido indolacético en la germinación, por ejemplo Polevov en 1959 (citado en 1) demostró que el contenido de ácido indolacético en el grano de maíz en el curso de su maduración se eleva hasta principios de septiembre y que después disminuye progresivamente.

De acuerdo con Janssen (citado en 1) la resistencia de cereales a la germinación prematura está en relación al contenido de auxina en el grano y demostró que en el curso de la maduración la auxina, abundante en el grano en estado le

choso se degrada mediante oxidación y se forma 3-metilen oxindol que es un inhibidor específico de la germinación prematura.

Bandurski y sus colaboradores han hecho amplios estudios sobre el ácido indolacético; averiguaron (20) que en las plantas se encuentra en forma libre (activa) y conjugada (inactiva). Estos investigadores postularon (21) que los conjugados de ácido indolacético están en todos los tejidos vegetales jugando un papel importante en el desarrollo vegetal. Hasta ahora son cuatro las funciones que les han encontrado: a) transporte; b) almacenamiento; c) protección contra la oxidación y d) control homeostático del ácido indolacético en la planta, también afirman (22) que los conjugados son sintetizados cuando los granos están madurando y son hidrolizados durante la germinación.

La destrucción del ácido indolacético se lleva a cabo mediante oxidación, obteniéndose como producto el 3-metilen oxindol, la oxidación se efectúa mediante dos procesos: uno enzimático (obscuridad) y una fotooxidación. La oxidación enzimática del ácido indolacético en las plantas superiores requiere manganeso y la enzima es acelerada por monofenoles e inhibida por polifenoles, ya que las sustancias fenólicas se encuentran en cantidades considerables en las plantas, deben tener alguna importancia como modificadores de la destrucción de la auxina (3).

GERMINACION PREMATURA

La germinación prematura es un fenómeno anormal en las semillas, ya que los granos germinan cuando el maíz se en

cuentra aún en el proceso de maduración (23). La influencia de las auxinas sobre la viviparidad fue considerada por Eeuwens (24) quien al trabajar con semillas de chicharo, de mostró que cambios marcados en la capacidad de germinación de los granos durante la maduración están fuertemente asociados con cambios en la cantidad de auxina, sus afirmaciones concuerdan con las de Routchenko (1) quien postuló que los granos de maíz germinan sobre la planta antes de su completa madurez si su contenido de ácido indolacético, que es normalmente elevado en el estado lechoso, no disminuye al venir el estado masoso. En sus estudios de inducción experimental de la germinación prematura, Routchenko (1) inyectó una solución de ácido indolacético en granos de maíz en el estado masoso y logró inducir la germinación.

Es probable que los niveles de ácido indolacético libre se regulen según los requerimientos del vegetal: si se requiere ácido indolacético libre hay hidrólisis de conjugados y si se requiere una disminución del ácido indolacético libre éste se conjuga. Como el nivel de ácido indolacético está relacionado con la germinación (1), según Epstein (22) su control debe estar acompañado por un control en la proporción a la cual los conjugados son sintetizados e hidrolizados. La observación de que durante la maduración el contenido de ácido indolacético disminuye y que durante la germinación aumenta puede explicarse si se asume que los ésteres de ácido indolacético son sintetizados cuando los granos están madurando y son hidrolizados durante la germinación (22). Además puede bajar el nivel de ácido indolacético libre mediante su oxidación que como afirmó Routchenko (1) conduce a la formación de un inhibidor de la germinación, pero requie

re de una actividad oxidativa adecuada que depende en gran parte de la actividad del fierro y manganeso presentes en el grano.

METODOS PARA DETERMINAR ACIDO INDOLACETICO

A pesar de que hace muchos años se reconoció al ácido indolacético como hormona, su estudio no avanzó satisfactoriamente debido a la carencia de buenos métodos para determinarlo: los bioensayos son tardados y están influenciados por otros componentes presentes en los extractos que los hacen inespecíficos y poco precisos y los ensayos colorimétricos son inconvenientes por su poca sensibilidad. La cromatografía de gases; la espectrometría de masas; el ensayo espectrofluorométrico en el que el ácido indolacético se transforma a la alfa pirona indólica por reacción con anhídrido acético; y la cromatografía de líquidos de alta presión son los métodos que actualmente están haciendo grandes contribuciones al estudio de las hormonas vegetales (25).

CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS (CG-EM)

Debido a que el ácido indolacético tiene un punto de ebullición relativamente alto, para su análisis por este método debe ser convertido a un derivado convenientemente volátil y estable. Los derivados usados son muy variados, por ejemplo, Mc Dougall (26) emplea un derivado sililado. Dependiendo del derivado se enfoca el espectrómetro de masas a un valor de m/c determinado, con lo que se logra detectar sólo los iones de interés. Al introducir la muestra al aparato después de su ionización por impacto electrónico ésta presen

ta un espectro de masas formado de un ión molecular (M^+) además de numerosos fragmentos iónicos (26).

Allen (27) en su determinación de ácido indolacético mediante esta técnica primero hizo la extracción; luego una purificación mediante cromatografía en capa fina, después la transformación al éster etílico N-heptafluorobutilado del ácido indolacético; continuando con la CG-EM: los iones producidos por la ionización de la muestra presentan una relación m/c de 399 y 326. La cuantificación la hizo por referencia a una curva de calibración (área del pico VS concentración de ácido indolacético) hecha con estándares tratados de igual forma que los extractos.

CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta presión es una técnica que en los últimos años ha probado ser de gran utilidad. Se han usado columnas en fase inversa y detectores de UV o fluorescencia y/o electroquímico.

Para determinar ácido indolacético en extractos Durley (28) primero realizó la extracción, luego purificó parcialmente el extracto con sephadex. Posteriormente efectuó la HPLC usando columnas de octadecilsílica y microoctadecilsílica, un cromatógrafo de líquidos con un monitor de absorbanza UV, dos bombas, un programador de flujo del disolvente y un inyector. La muestra disuelta en metanol la inyectó a una columna y eluyó usando un gradiente de metanol en agua acidificada, evaporó el eluato al vacío y lo inyectó a una segunda columna de donde eluyó nuevamente con un gradiente de metanol en agua acidificada, en esta segunda columna recromato

grafió la muestra, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo en agua. La cuantificación la hizo por medición de las alturas de los picos de absorción UV a 254 nm.

DILUCION ISOTOPICA

Este método se basa en el hecho de que un compuesto que tenga un contenido isotópico es inseparable por los procedimientos de laboratorio usuales de su análogo no isotópico. La cuantificación se hace de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Y = \left(\frac{C_0}{C} - 1 \right) X$$

X = cantidad adicionada de compuesto marcado

C₀ = contenido isotópico del compuesto adicionado

C = contenido isotópico del compuesto aislado

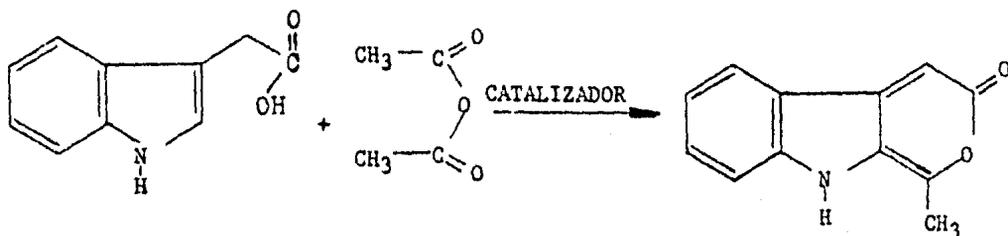
Y = cantidad del compuesto originalmente presente (29).

Por ejemplo Epstein (22) en su estimación del éster de mio-inositol del ácido indolacético: primero aplicó el éster radioactivo al material vegetal, luego hizo la extracción seguida de purificación y reducción de volumen, concluido lo anterior aplicó las muestras sobre placas de sílica gel donde visualizó el éster con el reactivo de Ehmann, la medición de la radioactividad la efectuó con un contador de centelleo. La cantidad del éster originalmente presente en el tejido (Y) la determinó con la ecuación mencionada.

DETERMINACION DE ACIDO INDOLACETICO MEDIANTE EL METODO DE FLUORESCENCIA DE LA ALFA PIRONA INDOLICA

Este método fue propuesto inicialmente por Stoessl (30) y se basa en que el ácido indolacético al reaccionar con el

anhidrido acético en presencia de un catalizador produce un compuesto fluorescente, la alfa pirona indólica:



Como catalizador de la reacción se usa un ácido de Lewis (31), al usar ácido trifluoroacético como catalizador de la reacción, ésta se lleva a cabo en quince minutos (30).

Eliasson (32) al realizar el método encontró que es necesario incluir procedimientos de purificación que eliminen los compuestos coloridos, porque éstos hacen imposibles las lecturas de fluorescencia.

Debido a que el ácido indolacético es susceptible a la oxidación (3) es necesario en lo posible evitarla, Iiro (33) comprobó que el uso del antioxidante 2,6-diterbutil-4-metilfenol (BHT) durante la determinación incrementa la fluorescencia y elimina su variabilidad, por su parte Morris (34) obtuvo buenos resultados usándolo en concentración 9 mM durante su medición de ácido indolacético de extractos vegetales.

Stoessl (30) para transformar el ácido indolacético a la alfa pirona indólica, le adicionó la mezcla de reacción formada por anhídrido acético y ácido trifluoroacético, dejó transcurrir quince minutos, transcurrido dicho período, paró la reacción adicionando una solución de carbonato de sodio al 5 %. Eliasson (32) encontró que los compuestos insolubles en agua causan opalescencia que restringe la determinación, por lo que adicionó etanol para evitar la opalescencia.

Para cuantificar Stoessl (30) hizo una curva de calibración (Fluorescencia Relativa VS concentración de AIA) que preparó transformando soluciones de concentración conocida de AIA, al compuesto fluorescente y leyendo la fluorescencia relativa contra un blanco, que preparó adicionando la solución de carbonato de sodio antes de añadir la mezcla de reacción y cuyo objetivo es, eliminar otras fluorescencias ajenas a la formación de la alfa pirona indólica.

OBJETIVO

Estudiar la variación en el contenido de ácido indolacético durante la maduración de los granos de maíz de las variedades H-32, H-139 y Criollo, con lo que se pretende contribuir al conocimiento de los mecanismos de germinación prematura.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

Se usó maíz de las variedades H-32, Criollo y H-139 donado por el Dr. Joaquín Ortiz Cereceres del Centro de Genética del Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. De cada variedad se trabajaron muestras en tres diferentes grados de maduración: estado lechoso (23-30 días después de la floración) estado masoso (50-57 días después de la floración) y madurez comercial (125 días después de la floración).

Los reactivos que se utilizaron fueron de grado q.p. :

- Acido trifluoroacético de Aldrich Chemical Company Inc.
- Metanol de JT Baker
- Carbonato de Sodio de JVC
- Hidróxido de potasio de JVC
- β -mercapto etanol de Merck
- Etanol de Monterrey
- Polivinil pirrolidona de Química Farmacéutica Latina S.A.
- Dietil Amino Etil Celulosa de Sigma Chemical Company
- Ditio carbamato de dietilo de Sigma Chemical Company
- Acetato de amonio de Técnica Química S.A.
- Acido acético de Técnica Química S.A.
- Anhidrido acético de Técnica Química S.A.
- Acido clorhídrico
- Acido indolacético
- Drierite (CaSO_4) anhidro de W.A. Hammond Drierite Co

Las soluciones que se usaron fueron :

- Solución de Na_2CO_3 al 10 %
- Solución de KOH 0.01 N
- Solución de NH_4OAc 0.1 M pH 6.5
- Solución de NH_4OAc 0.01 M pH 6.5
- Solución de CH_3COOH 1.5 M

Solución de HCl 2 M

Solución de HCl 1 N

Los aparatos que se utilizaron fueron:

Balanza analítica Mettler H 80

Balanza granataria Ohaus

Bomba de vacío Sarbent Welch doble sello

Centrífuga clínica

Estufa de vacío Heraeus

Fluorómetro Turnover modelo 110: λ de excitación 360 nm;
 λ de emisión 415 nm.

Licuadaora Taurus

Molino Julatti

PREPARACION DE ACETATO DE DEAE-CELULOSA (35)

Se pesaron 20 g de DEAE-Celulosa en un vaso de precipitado de 400 ml, se adicionaron 200 ml de una solución de HCl 1 N, se vació rápidamente a un büchner (con un papel de filtración rápida). Se lavó con 500 ml de agua. El procedimiento anterior se repitió tres veces. La DEAE-Celulosa ya lavada se puso en contacto con 100 ml de ácido acético glacial. Se removió el exceso de ácido lavando tres veces con 120 ml de metanol.

PREPARACION DE POLIVINIL PIRROLIDONA

Se preparó de acuerdo con el método de Morris (31) como sigue: En un vaso de 400 ml se colocaron 120 g de polivinil pirrolidona, se añadieron 100 ml de una solución de

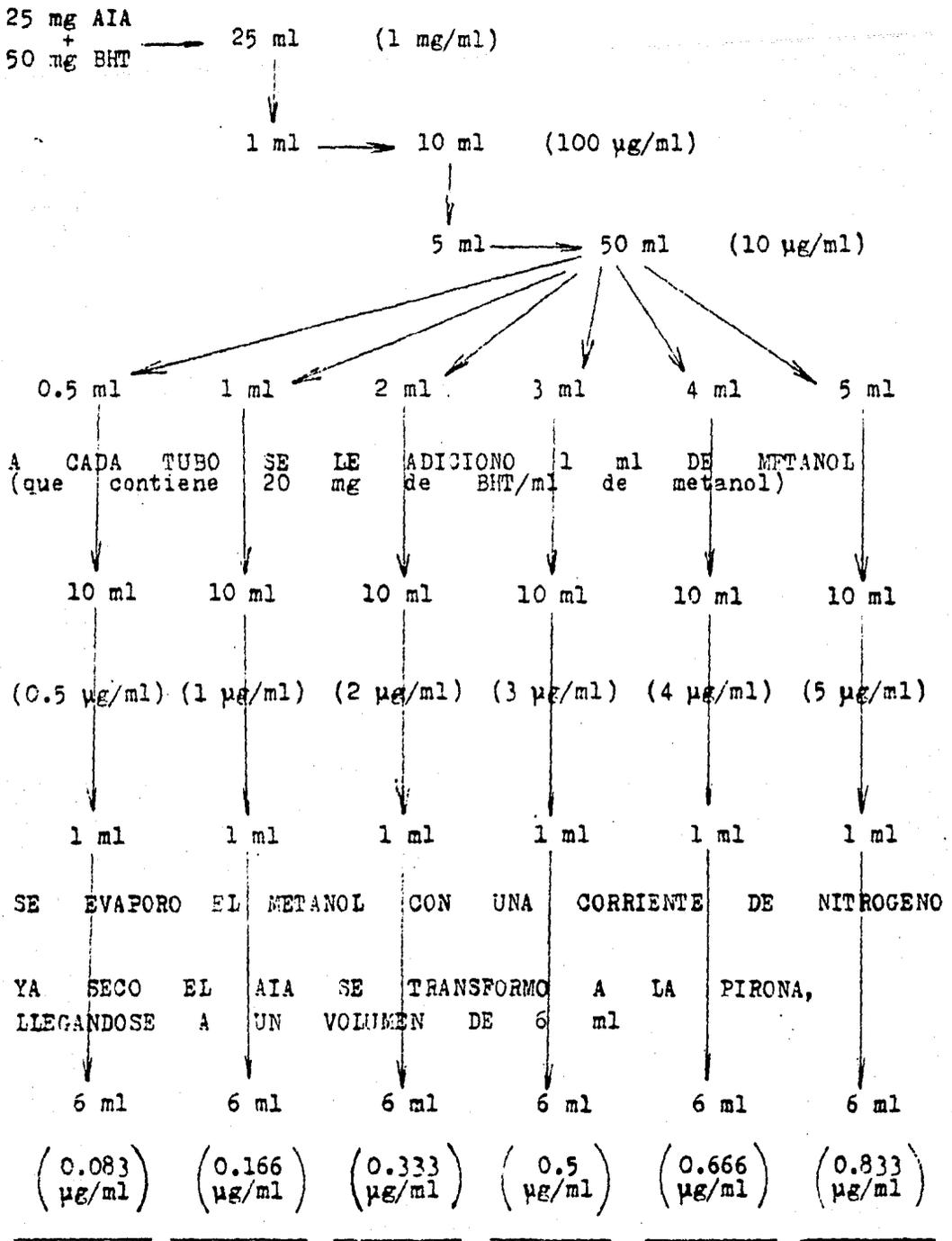
HCl 2 M, rápidamente se filtró en un büchner (con un papel de filtración rápida). Se lavó con un litro de agua para eliminar el exceso de ácido. Se adicionaron 70 ml de una solución de NH_4OAc 0.01 M hasta ajustar el pH de la poli vinil pirrolidona a 6.5

CURVA ESTANDARD I DE AIA.

Se prepararon seis tubos de ensaye con 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 μg de ácido indolacético (AIA) disueltos en 1 ml de metanol (30). A la solución inicial a partir de la cual se hicieron las diluciones para llegar a las concentraciones mencionadas se le adicionó 2,6-diterbutil-4-metilfenol (BHT), 2 mg de BHT/ml de solución (33,34).

Se evaporó el metanol de los tubos usando una corriente de nitrógeno, cuidando de no dejar residuos en las paredes (30).

La reacción para formar el compuesto fluorescente se hizo mediante una modificación de la técnica descrita por Stoessl (30), a dos tubos que funcionaron como blanco se les agregaron 5 ml de una solución de Na_2CO_3 al 10 %, a los ocho tubos se les agregó 0.1 ml de anhídrido acético y 0.1 ml de ácido trifluoroacético, se agitaron los tubos y se mantuvieron quince minutos a cero grados centígrados, transcurrido este tiempo, se agregó 5 ml de Na_2CO_3 a los tubos que no se les había adicionado, se agitaron, y a todos los tubos se les añadió 1 ml de etanol, se filtraron las suspensiones y se leyó la fluorescencia relativa, se calcularon las concentraciones de AIA en $\mu\text{g}/\text{ml}$ de las soluciones finales:

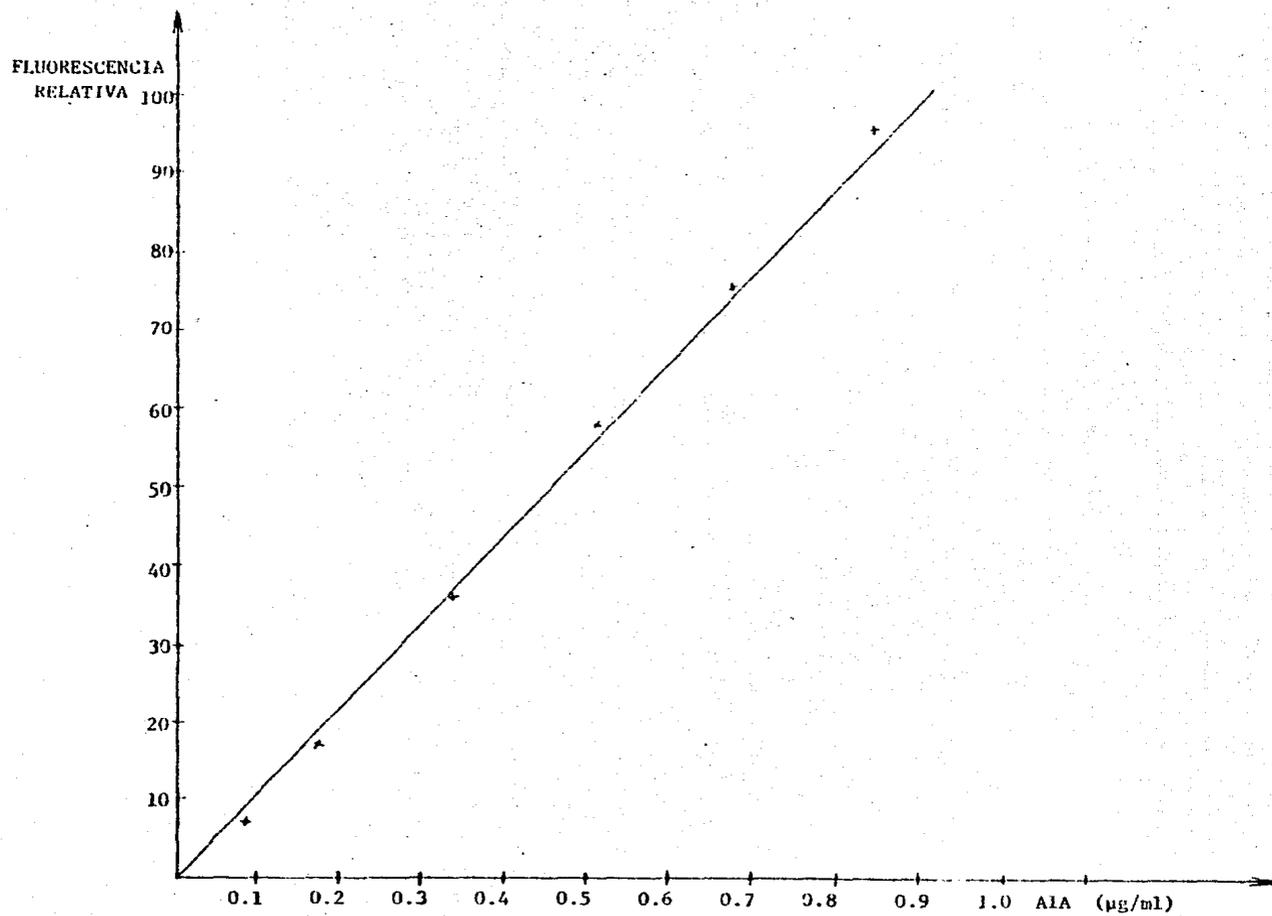


Se puso BHT en la solución inicial (2 mg BHT/ml de solución); pero como va disminuyendo al hacer las diluciones, nuevamente se añadió, esta vez en las soluciones de las que se tomó el mililitro para el secado del AIA, se puso un ml de metanol que contenía 20 mg de BHT/ml ya que al hacerse la correspondiente dilución 1:10 el BHT que quedó en la relación adecuada (2 mg de BHT/ml de solución).

Se hizo la curva por triplicado, se promediaron los valores de fluorescencia relativa y se graficaron los resultados (GRAFICA No. 1) :

| AIA ($\mu\text{g/ml}$) | EXPERI MENTO 1 | EXPERI MENTO 2 | EXPERI MENTO 3 | \bar{x} | DESVIACION ESTANDARD |
|-----------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------|-------------------------|
| | FLUORES CENCIA RELA- TIVA | FLUORES CENCIA RELA- TIVA | FLUORES CENCIA RELA- TIVA | | |
| 0.083 | 8.0 | 7.0 | 9.5 | 8.16 | 1.02 |
| 0.166 | 19.0 | 17.0 | 18.0 | 18.00 | 0.81 |
| 0.333 | 38.5 | 37.0 | 36.5 | 37.33 | 0.84 |
| 0.500 | 58.0 | 56.5 | 56.5 | 57.25 | 0.75 |
| 0.666 | 77.5 | 73.0 | | 72.25 | 2.25 |
| 0.833 | 98.0 | 96.0 | 91.5 | 95.16 | 2.71 |

GRAFICA No. 1 : CURVA ESTANDARD I DE AIA



CURVA ESTANDARD II DE AIA.

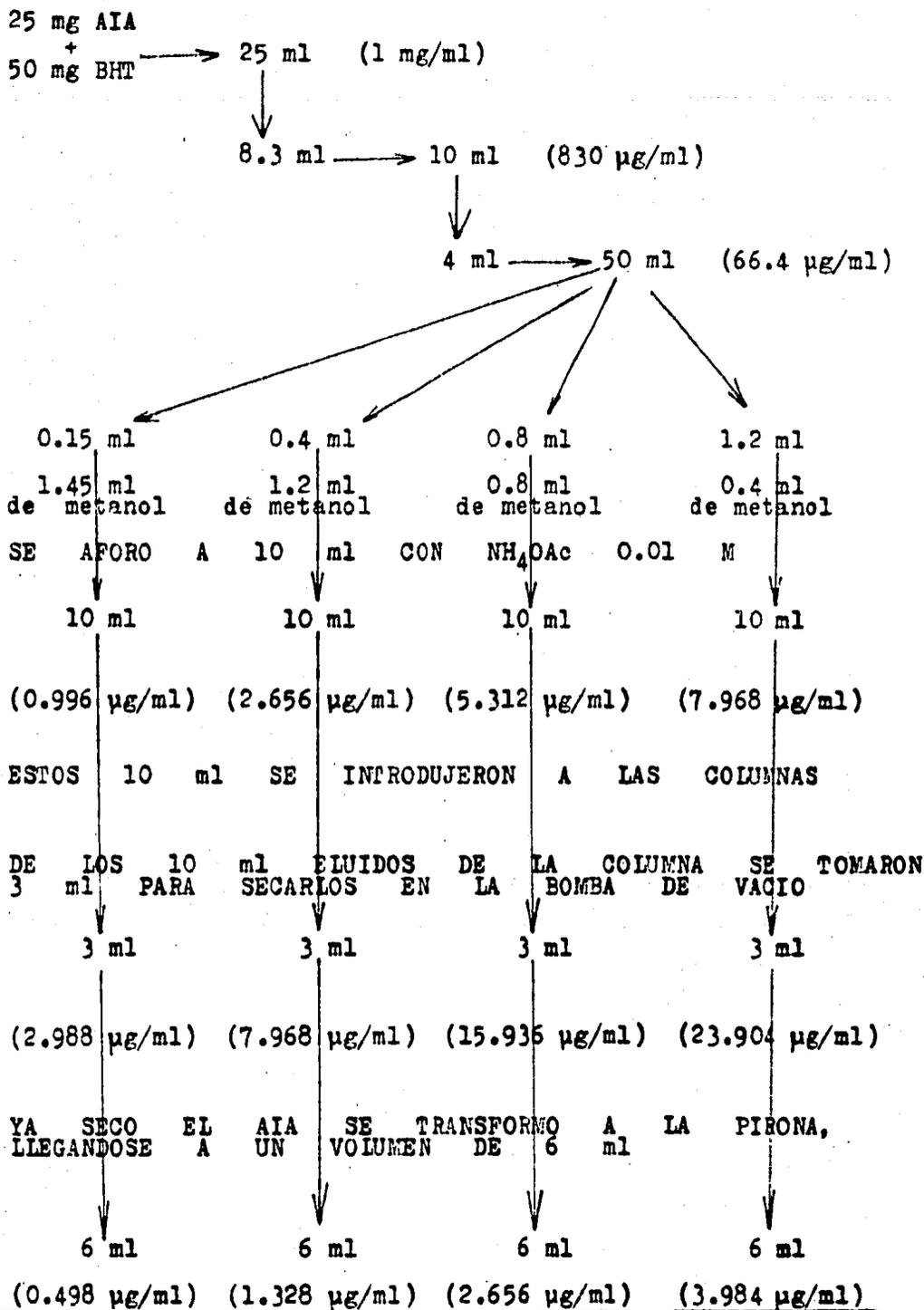
Una vez obtenida la curva estándar I de AIA se hizo otra curva sometiendo al AIA a las mismas condiciones que se someterían los extractos, que consiste en el tratamiento de los mismos con polivinil pirrolidona y adsorción del AIA en una columna de intercambio iónico de DEAE-Celulosa. Las columnas están constituidas por jeringas desechables de diez mililitros desprovistas de émbolo y aguja.

Se empaquetaron las columnas de intercambio iónico colocando en la punta de cada una un tapón de algodón de 0.0215 g. En vasos de precipitado de 50 ml se hicieron suspensiones con 0.6 g de DEAE-Celulosa y 15 ml de una solución de NH_4OAc 0.01 M se pusieron las suspensiones en las columnas rápida y uniformemente, se agregaron 2 ml más de NH_4OAc para arrastrar todo el contenido del vaso que también se llevó a la columna. Se ensamblaron a las columnas en la parte superior otras columnas a las que previamente se colocó un tapón de algodón de 0.1283 g. Aparte se prepararon cuatro vasos de precipitado de 50 ml con 10 ml de solución conteniendo 0.996, 2.656, 5.312 y 7.96 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AIA, a la solución inicial de AIA a partir de la cual se hicieron las diluciones para alcanzar las concentraciones mencionadas se le añadió 2 mg de BHT/ml de solución, a cada vaso de precipitado se le adicionaron 0.2 g de polivinil pirrolidona, las suspensiones así formadas se pusieron en las columnas superiores. El AIA queda unido en las colum

nas de intercambio, la solución que sale se desecha. Después se eluyó el AIA de las columnas intercambiadoras con 9 ml de una solución de ácido acético 1.5 M, recibiendo en matraces aforados de diez mililitros, se aforaron los matraces con metanol (que contiene 20 mg de BHT/ml de METANOL), de cada matraz se llevaron 3 ml a un matraz de bola quickfit de 25 ml para la evaporación del disolvente en una bomba de alto vacío (1 mm de Hg), se conectaron a la bomba dos mangueras, con lo que se secaron dos muestras simultáneamente.

El AIA que quedó como residuo en el matraz se transformó al compuesto fluorescente como se describió anteriormente.

Se leyó la fluorescencia relativa y se calcularon las concentraciones de AIA :

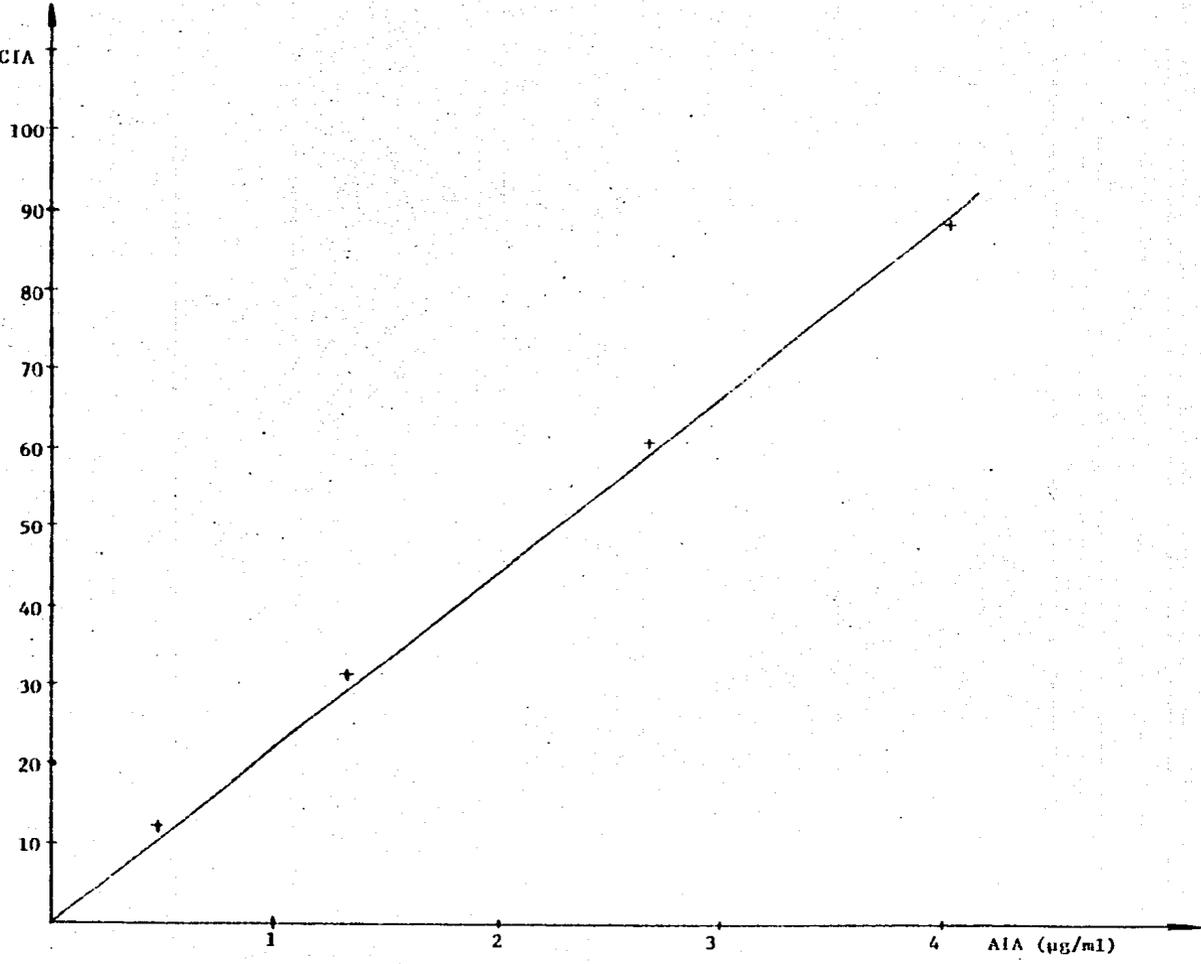


Se promediaron los valores de fluorescencia relativa obtenidos y se procedió a construir la gráfica (GRAFICA No. 2) :

| AIA ($\mu\text{g/ml}$) | EXPERIMENTO 1 FLUORESCENCIA RELATIVA | EXPERIMENTO 2 FLUORESCENCIA RELATIVA | EXPERIMENTO 3 FLUORESCENCIA RELATIVA |
|-----------------------------|--|--|--|
| 0.498 | 11 | 14 | 14 |
| 1.328 | 32 | 32 | 32 |
| 2.656 | 59 | 62 | 56 |
| 3.980 | 86 | 87 | 90 |

| EXPERIMENTO 4 FLUORESCENCIA RELATIVA | EXPERIMENTO 5 FLUORESCENCIA RELATIVA | EXPERIMENTO 6 FLUORESCENCIA RELATIVA | \bar{x} | DESVIACION ESTANDARD |
|--|--|--|-----------|-------------------------|
| 7 | 13 | 10 | 11.50 | 2.50 |
| 32 | 26 | 31 | 30.83 | 2.40 |
| | | | 59.00 | 2.40 |
| 91 | 86 | 88 | 88.00 | 1.91 |

FLUORESCENCIA
RELATIVA



GRAFICA No. 2 : CURVA ESTANDARD II DE AIA

Se calcularon las pendientes de las dos curvas estándar para corregir por pérdidas durante la determinación (GRAFICA No. 3)

La pendiente de la curva I se consideró como el 100 % y se calculó el porcentaje de la curva II con respecto a la I

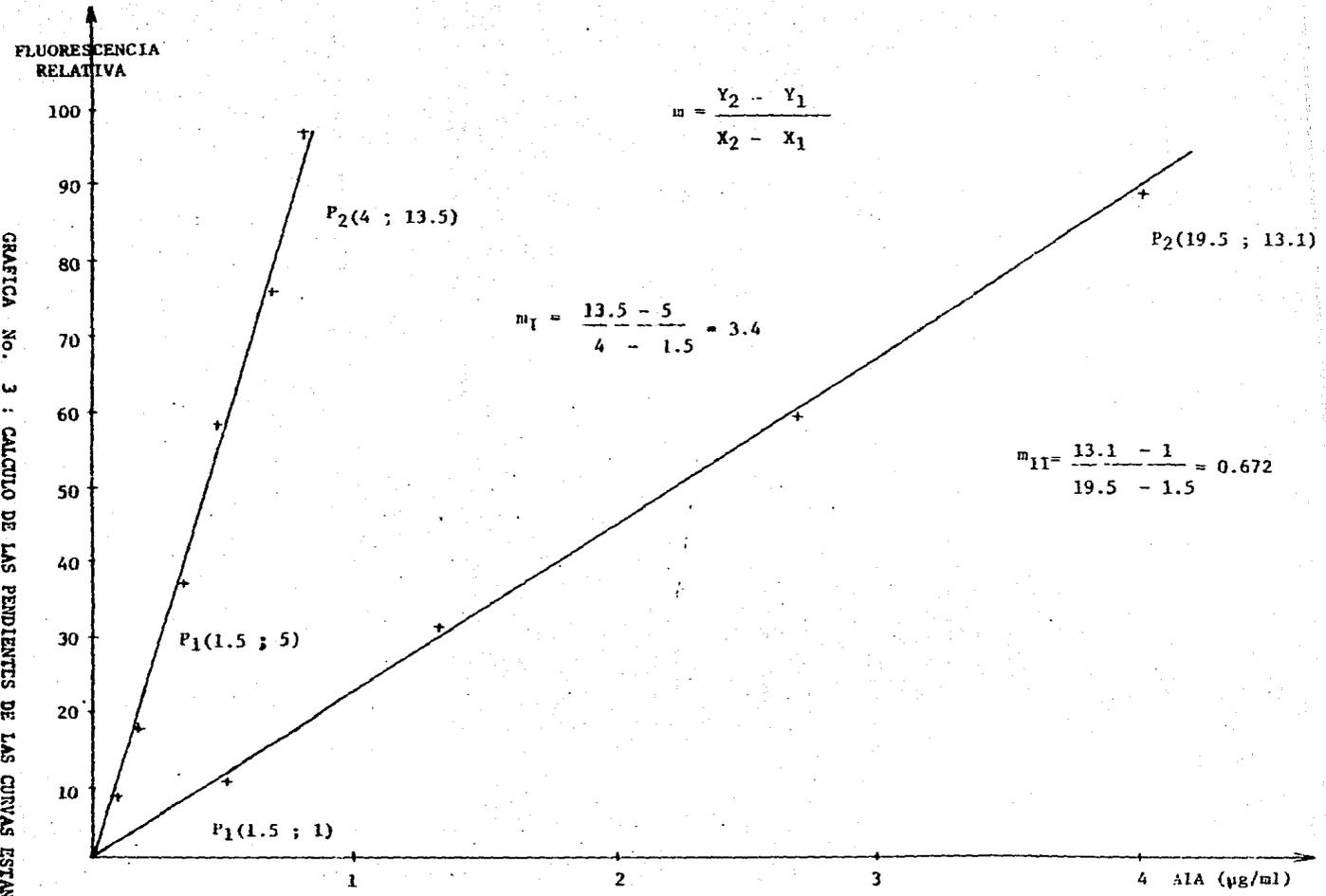
$$\begin{array}{rcl}
 3.4 & \text{-----} & 100 \% \\
 0.672 & \text{-----} & X \qquad X = 19.76 \% \\
 \\
 100 \% & - & 19.76 \% = 80.23 \%
 \end{array}$$

La corrección aplicada fue que a cada una de las concentraciones obtenidas por interpolación de los valores de fluorescencia relativa en la curva estándar I se les considerara como el 19.76 %, se calculó el 80.23 % de éstas y se sumaron los dos valores:

$$\begin{array}{rcl}
 \mu\text{g/ml obtenidos en la interpolación} & \text{-----} & 19.7653 \% \\
 X & & \text{-----} 80.23 \%
 \end{array}$$

$$X + \mu\text{g/ml obtenidos en la interpolación} = \mu\text{g/ml corregidos}$$

GRAFICA No. 3 : CALCULO DE LAS PENDIENTES DE LAS CURVAS ESTANDAR
35



DETERMINACION DEL % DE HUMEDAD

Usando el molino se pulverizó la muestra, una parte del polvo se pesó y se metió a la estufa de vacío a 50 °C hasta peso constante, lo anterior fue posible cuando el maíz es ma duro comercialmente ya que facilmente se realiza la pulveri zación; pero cuando está en los estados lechoso y masoso no es posible su pulverización por lo que se pesaron unos gra nos y se metieron a la estufa de vacío una vez eliminada la humedad que les impedía ser molidos se pesaron y se molieron, una parte del polvo se pesó y se metió a la estufa hasta pe so constante, se sumaron los dos porcentajes de humedad para obtener el % de humedad de la muestra.

- m_h = muestra húmeda
- m_{sh} = muestra semihúmeda
- m_{sh}' = muestra semihúmeda que se lleva a peso constante
- m_s = muestra seca

H - 32

| | LECHOSO | MASOSO |
|-----------|-----------|-----------|
| m_h | 19.2997 g | 20.1158 g |
| m_{sh} | 9.0537 g | 16.2339 g |
| m_{sh}' | 1.0133 g | 1.0110 g |
| m_s | 0.9570 g | 0.9237 g |

CRIOLLO

| | <u>LECHOSO</u> | <u>MASOSO</u> | <u>MADUREZ COMERCIAL</u> |
|-----------|----------------|---------------|------------------------------|
| m_h | 20.1120 g | 20.4241 g | |
| m_{sh} | 9.2743 g | 14.2047 g | |
| $m_{sh'}$ | 1.0103 g | 1.0095 g | 1.0082 g |
| m_s | 0.9199 g | 0.8976 g | 0.8911 g |

H-139

| | <u>LECHOSO</u> | <u>MASOSO</u> | <u>MADUREZ COMERCIAL</u> |
|-----------|----------------|---------------|------------------------------|
| m_h | 20.1905 g | 20.0467 g | |
| m_{sh} | 7.2262 g | 15.4484 g | |
| $m_{sh'}$ | 1.0198 g | 1.0102 g | 1.0160 g |
| m_s | 0.9154 g | 0.9220 g | 0.9014 g |

DETERMINACION DEL AIA DE LAS MUESTRAS

Las muestras se prepararon con los granos de diez mg zorcas, de cada mazorca solamente se usó el 60 % central, se homogenizó la muestra y de allí se tomaron diez gramos para preparar el extracto en una adaptación del método de Morris, como sigue :

En un vaso de precipitado de 250 ml se pesaron 10 g de muestra añadiendo 16 ml de metanol, 4 ml de una solución de NH_4OAc 0.1 M, 40 mg de BHT, 40 mg de DIECA y 2 gotas de β -mercapto-etanol, se molió la mezcla durante un minuto y se

centrifugó dos minutos a 2500 RPM. El sobrenadante se llevó a 100 ml con NH_4OAc , con 10 ml de esta solución se hizo la suspensión de polivinil pirrolidona y se continuó el procedimiento que se describió para la curva estándar II, se usó un blanco de extracto que se trató de la misma manera que en la curva estándar. Los valores de fluorescencia relativa obtenidos se interpolaron en la curva estándar I y como se muestra en el ejemplo siguiente se calcularon las concentraciones de AIA de cada una de las muestras.

| FR | \bar{X}_{FR} | desviación estándar | interpolando en la curva I | corrigiendo con la curva II |
|----|----------------|---------------------|---|---|
| 76 | 79.33 | 3.39 | 0.695 $\mu\text{g/ml}$ | 0.695 $\mu\text{g/ml}$ — 19.7653 % |
| 78 | | | | X — 80.23 % X = 2.821 $\mu\text{g/ml}$ |
| 84 | | | 0.695 $\mu\text{g/ml}$ + 2.821 $\mu\text{g/ml}$ = 3.51 $\mu\text{g/ml}$ | |

considerando las diluciones en cada paso del procedimiento y para dar los resultados en $\mu\text{g/g}$:

$$\frac{\left(3.51 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right) \left(6 \text{ ml}\right) \left(\frac{10 \text{ ml}}{3 \text{ ml}}\right)}{\frac{10 \text{ g} \times 10 \text{ ml}}{100 \text{ ml}}} = 70.2 \mu\text{g/g}$$

considerando el % de humedad de la muestra :

% de humedad = 55.69 % . . . 44.3 % de muestra

Se usó un gramo de maíz húmedo y descartando la humedad corresponde a 0.443 g

$$\frac{70.2 \mu\text{g}}{0.443 \text{ g}} = \underline{\underline{158.46 \mu\text{g/g}}}$$

RESULTADOS Y DISCUSION

El método que se empleó para la determinación del AIA consta de cuatro pasos: 1) extracción del AIA de los granos de maíz; 2) purificación del extracto; 3) eliminación del disolvente; y 4) transformación del AIA a la alfa pirona indólica para su determinación mediante fluorometría.

E X T R A C C I O N

El extracto se preparó adicionando a granos de maíz: a) metanol, como disolvente, b) acetato de amonio 0.1 M pH 6.5, para asegurar la presencia del AIA libre y eliminar proteínas, y c) β -mercaptoetanol, ditiocarbamato de dietilo (DIECA) y 2,6-diterbutil-4-metilfenol (BHT), para proteger al AIA de la oxidación, se molió y se centrifugó a 2500 RPM, el sobrenadante se llevó a un volumen de 100 ml con acetato de amonio 0.01 M pH 6.5

El metanol al 80% resulta un disolvente apropiado tanto del AIA como de los antioxidantes adicionados. Hemberg (36) en su estudio sobre disolventes para la extracción del AIA encontró al metanol como el más adecuado.

Tomaszewski (37) en sus trabajos sobre la descarboxilación del AIA encontró que el DIECA actúa como un poderoso inhibidor de la oxidación enzimática del AIA, debido a que es inestable en una solución ligeramente ácida:

$$(C_2H_5)_2NCSSH \longrightarrow (C_2H_5)_2NH + COS + H_2S$$

y sus productos de descomposición actúan como inhibidores de la enzima.

Por otro lado Iino (33) encontró que el BHT además de proteger al AIA de la oxidación, aumenta la fluorescencia, por lo que se agregó BHT para tener la concentración 9 mM sugerida por Morris (34).

Hemberg (36) observó que la duración de la extracción tiene una influencia determinante sobre el rendimiento de AIA del extracto, ya que un período de extracción largo puede admitir la síntesis de AIA de sus precursores o la hidrólisis de las formas conjugadas. Una extracción conveniente para AIA libre requiere un pH ácido, en cambio la extracción de AIA conjugado requiere que se realice una hidrólisis alcalina: para hidrolizar ésteres basta una hidrólisis suave con NaOH 1 N a 22-25 °C durante una hora, en cambio para hidrolizar AIA peptídico se requiere una hidrólisis en NaOH 7 N a 100 °C durante tres horas (38). En este trabajo se extrajo AIA libre.

PURIFICACION

Como se requiere la eliminación de pigmentos y fenoles que se encuentran en cantidades considerables en los extractos vegetales (3), en el procedimiento de purificación se incluyeron dos columnas, una de DEAE-Celulosa para eliminar los pigmentos y otra de polivinil pirrolidona (PVP) para eliminar los fenoles (34).

Se ha propuesto que la PVP elimina los fenoles de los extractos vegetales mediante la formación de puentes de hi

drógeno (39,40). Andersen (41) estudió la influencia del pH sobre la adsorción de los fenoles por la PVP y sugirió, que los enlaces formados, son del tipo de puentes de hidrógeno, ya que determinando el espectro de absorción entre 220 y 420 nm, de soluciones de fenoles a pH 8.5, 6 y 3.5, encontró que el pH más adecuado para el enlace fue 3.5. También efectuó la disociación del enlace que se forma entre los fenoles y la PVP, utilizando Urea 8 M (que experimentalmente se emplea para disociar puentes de hidrógeno).

Después de eliminados los fenoles al hacer pasar el extracto a través de la columna de DEAE-Celulosa, el ácido indolacético al igual que los pigmentos se retienen en la columna debido a que los ácidos se enlazan a los grupos iónicos de la resina formando una sal, posteriormente de la columna se eluye el ácido indolacético con ácido acético mientras que los pigmentos quedan retenidos (34, 35).

Fue indispensable añadir nuevamente una concentración 9 mM de 2,6-diterbutil-4-metilfenol al ácido indolacético eluido de las columnas porque siendo un fenol es eliminado del extracto al pasar por la columna de PVP.

Se tuvo que hacer una estandarización en las columnas con el objeto de hacer muy similar el tiempo de elución. Para esto se pesó el algodón que se puso en la punta de las columnas, y la cantidad de PVP y DEAE-Celulosa fueron constantes, el transvasado de las suspensiones a las columnas se hizo lo más uniformemente posible. La purificación se hizo por triplicado.

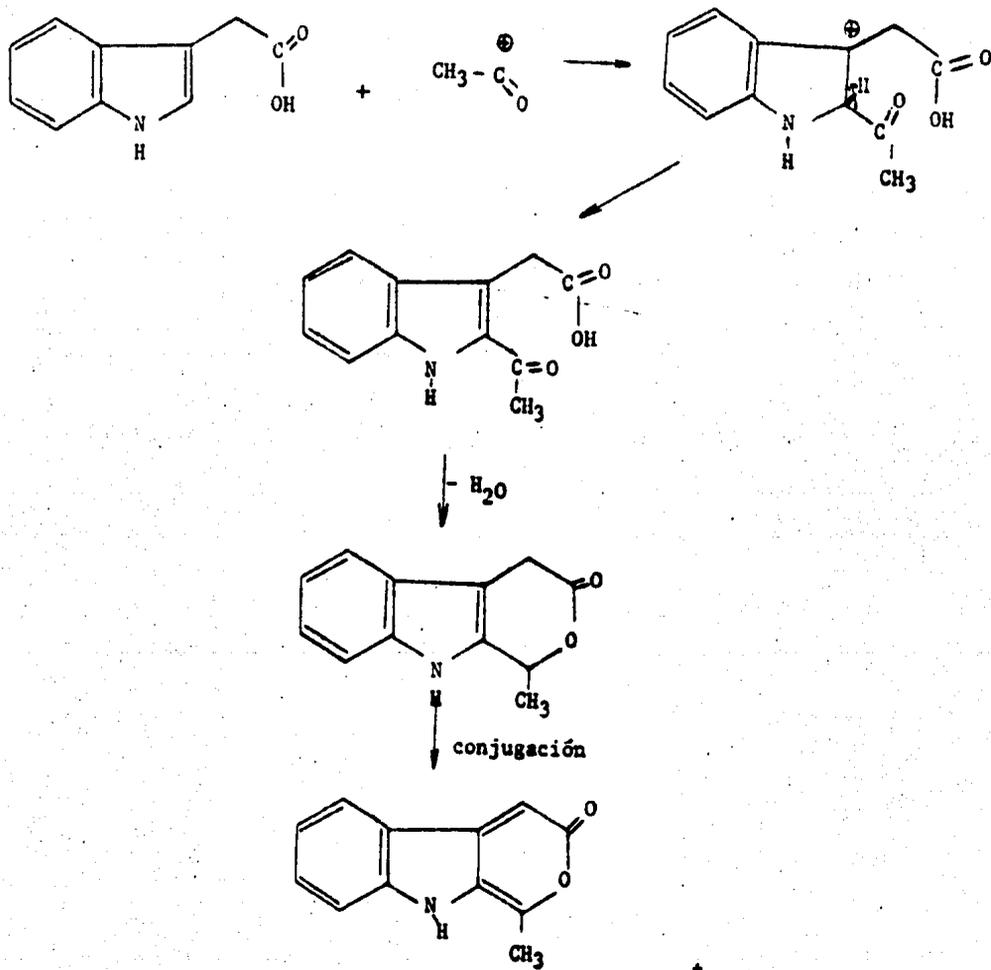
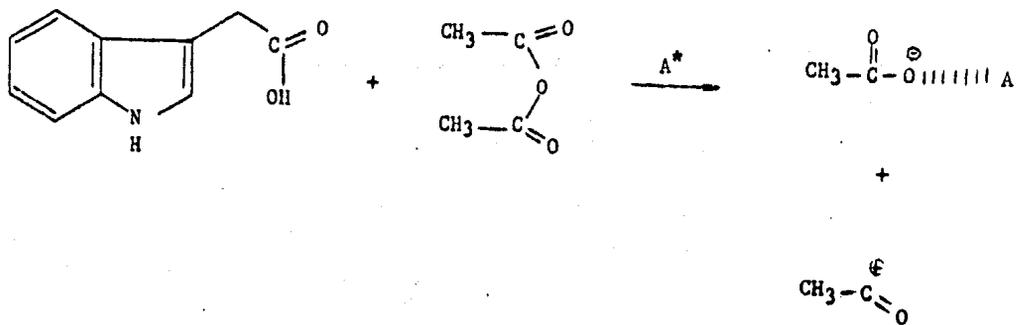
ELIMINACION DEL DISOLVENTE

El método fluorescente exige que se tenga ácido indolacético sin disolventes protónicos, por lo que el disolvente de la solución de ácido indolacético, que está formado por 90 % de ácido acético y 10 % de metanol se evaporó en una bomba de alto vacío, el metanol se deja evaporar lentamente para que no se extienda en las paredes del matraz; se pretende que el ácido indolacético ocupe la menor superficie del matraz, ya que al formar la pirona como el volumen de la mezcla de reacción es muy pequeño (0.2 ml) el ácido indolacético que quede en las paredes del matraz tendrá menos posibilidades de ponerse en contacto con la mezcla de reacción y lo más probable es que ocasione pérdidas de ácido indolacético por una mala evaporación del disolvente.

TRANSFORMACION DEL ACIDO INDOLACETICO A LA ALFA PIRONA FIUORESCENTE

Para formar las alfa pironas indólicas se requieren:
a) derivados indólicos que tengan la posición 2 libre y un grupo carboximetilo en la posición 3, b) anhídrido acético y c) un catalizador (30).

La reacción es una sustitución electrofílica en la posición 2 del indol, y el catalizador de la reacción puede ser cualquier ácido de Lewis que acepte el par electrónico proporcionado por el oxígeno del anhídrido, mediante esta coordinación se forma el electrófilo que sustituye al hidrógeno de la posición 2 del indol :



A^* = ácido de Lewis

Aunque el método no distingue entre el ácido indolacético y ácidos indolacéticos sustituidos en el anillo benzenico o en el átomo de nitrógeno, esto no es una limitación importante, ya que Stoessl (30) al probar diferentes indoles, solamente encontró dos pironas con propiedades espectroscópicas similares a la obtenida a partir de ácido indolacético, la pirona obtenida a partir de 4-Cl-AIA y la obtenida a partir de 5-OH-AIA. Otro problema posible es la conversión de ácido indolpirúvico a AIA (33), esta conversión se disminuye significativamente reduciendo la duración de la extracción. La formación de la alfa pirona indólica no incluye a los conjugados, de hecho cuando se quiere determinar AIA conjugado se recurre a una hidrólisis alcalina (42). En nuestra determinación la posibilidad de cuantificar conjugados radica en aquellos que se lleguen a hidrolizar durante la extracción.

Durante el transcurso del tiempo de reacción para la formación de la pirona se agitan repetidas veces los matrazes con el fin de poner en contacto el ácido indolacético con la mezcla de reacción.

Para parar la reacción se usa una solución de carbonato de sodio, que elimina el exceso de anhídrido acético, inicialmente se tenía problema en este punto, ya que usando como Stoessl (30) una solución de carbonato de sodio al 5 % la eliminación del anhídrido acético se obtenía sólo parcialmente ocasionando turbidez en las soluciones, que hacía imposible las lecturas, este problema se solucionó usando la solución de carbonato de sodio al 10 %.

Para tener un blanco de extracto, se adicionó a una muestra antes de la mezcla de reacción el carbonato de sodio (30), como la reacción del anhídrido acético con el carbonato de sodio es rápida, elimina el anhídrido acético impidiéndole reaccionar con el ácido indolacético para formar la pirona, con este blanco se eliminan otras fluorescencias que podrían estar en el extracto y que no sean debidas a la pirona.

La fluorescencia obtenida se comparó con una curva estándar que se muestra en la página 33. Esta curva se construyó dando a muestras conocidas de AIA el mismo tratamiento que a los extractos y se hizo con el fin de evaluar pérdidas de AIA durante el procedimiento, en su elaboración se usaron soluciones de diferente concentración y se emplearon tres juegos de columnas para que el tiempo empleado en someter a las soluciones al procedimiento de purificación fuera similar al tiempo empleado en la purificación de los extractos, considerando que a mayor tiempo el AIA es más susceptible de sufrir fotooxidación (3).

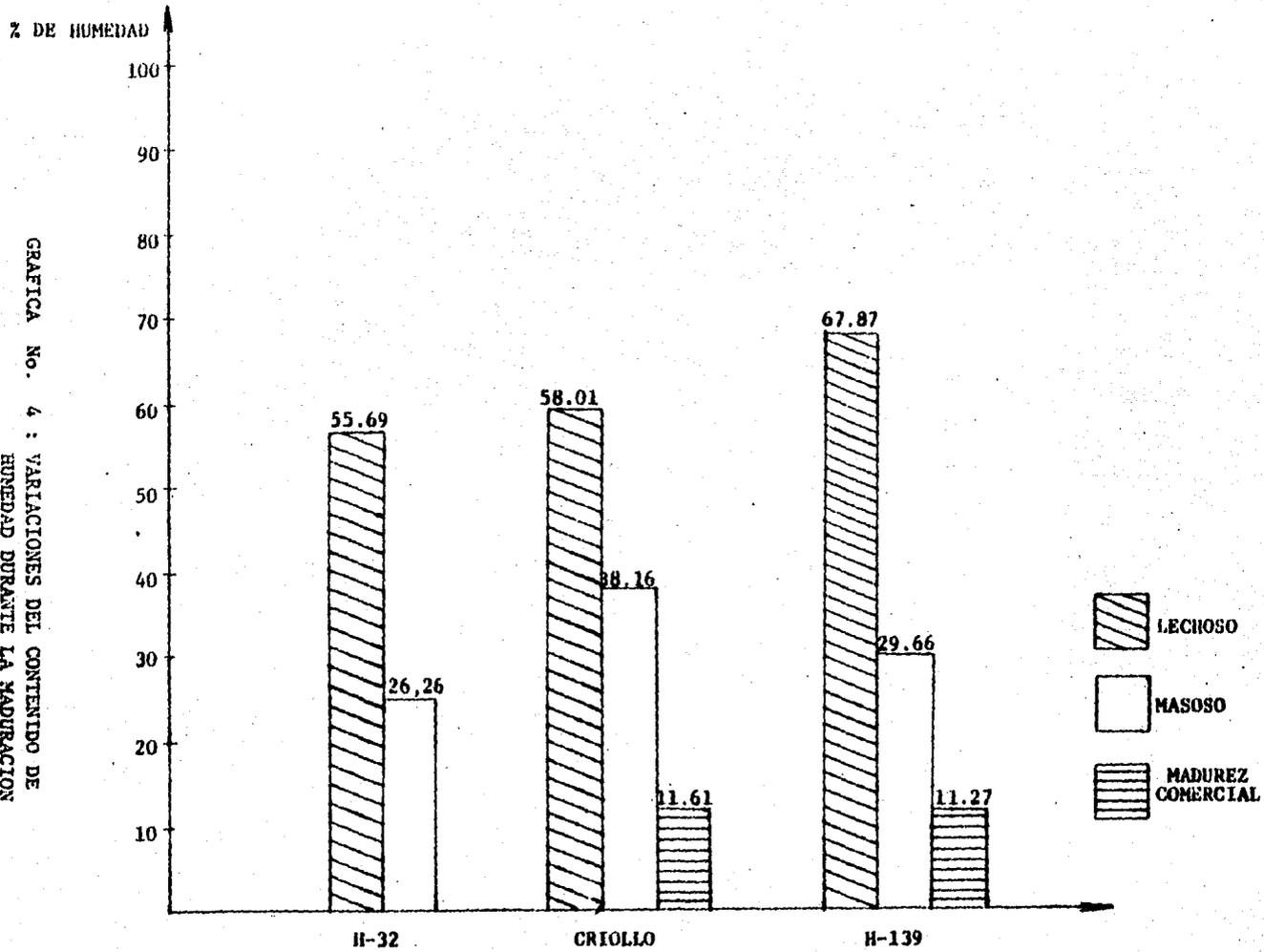
Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas 4 y 5. Al analizar los resultados puede verse lo siguiente:

a) En las tres variedades de maíz estudiadas, el contenido de humedad varía inversamente con la maduración del grano, ya que el orden ascendente de maduración es: lechoso → masoso → madurez comercial. El mayor contenido de humedad corresponde a la variedad H-139 en el estado lechoso.

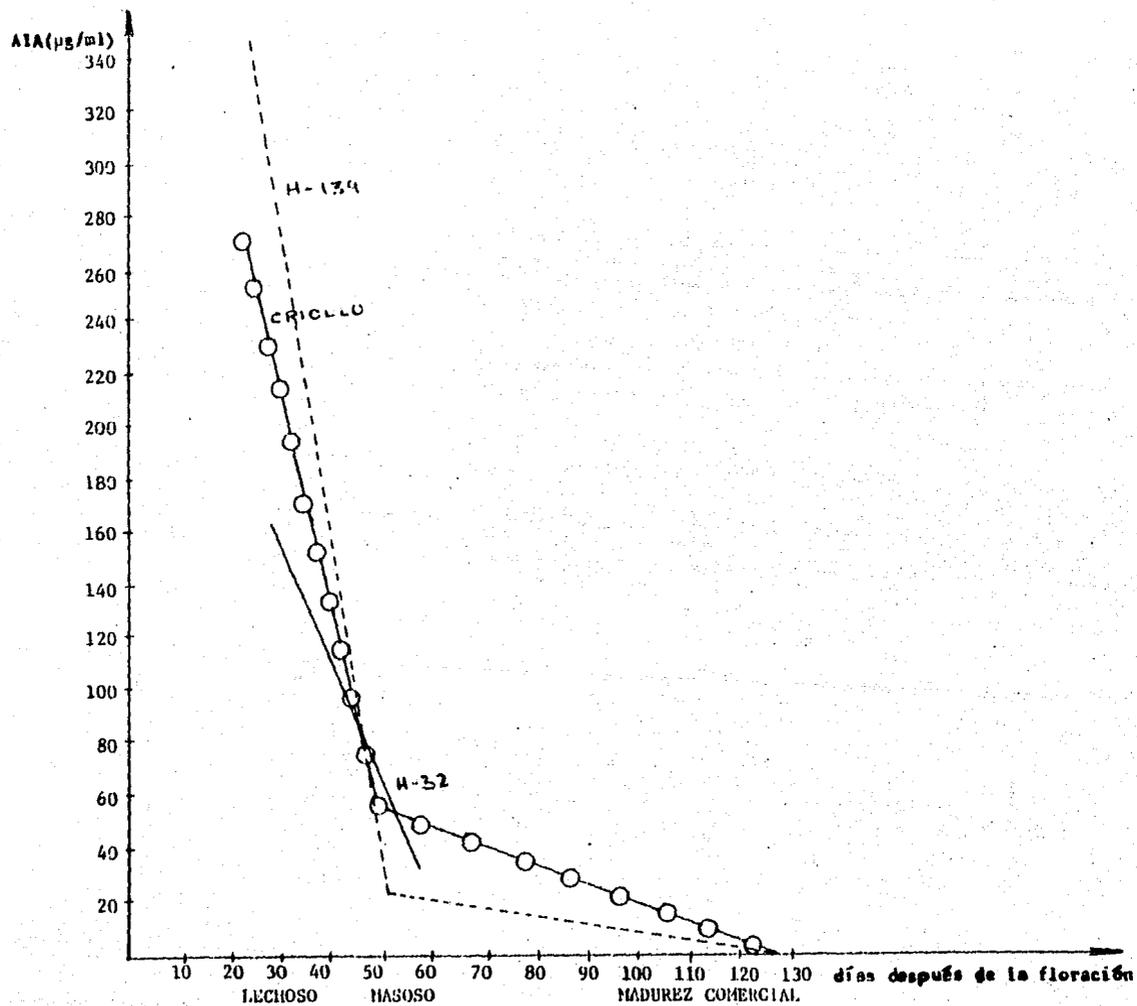
b) Hay diferencias en el contenido de ácido indolacético de los granos de maíz de una variedad a otra. Puede verse en la gráfica 5 que en el estado lechoso la concentración más alta de AIA está en la variedad H-139, que según los resultados de la evaluación realizada por el Dr. Joaquín Ortiz Cereceres (43) es la que presentó el mayor porcentaje de germinación durante el ciclo agrícola 1982.

c) El contenido de ácido indolacético de las tres variedades de maíz estudiadas, disminuye al aumentar la maduración de los granos como se muestra en la gráfica 5. Las tres variedades en estado masoso tienen un contenido bajo de AIA. De acuerdo con Routchenko (1) el maíz germina en estado masoso cuando su contenido de AIA es muy alto. Durante 1982 no se presentó en forma significativa la germinación prematura, probablemente por la sequía que hubo y puede afirmarse que las tres variedades de maíz estudiadas presentaron una conducta normal en lo que se refiere a variación en el contenido de ácido indolacético durante la maduración.

GRAFICA No. 4 : VARIACIONES DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DURANTE LA MADURACION



GRAFICA No. 5 : VARIACIONES DEL CONTENIDO DE ACIDO
INDOLACETICO DURANTE LA MADURACION



RESUMEN Y CONCLUSIONES

- Se determinó ácido indolacético durante la maduración de semillas de maíz de las variedades H-32, H-139 y Criollo, usando una adaptación del método de la alfa pirona propuesto por Stoessl (30).
- El aislamiento y la purificación del ácido indolacético se llevaron a cabo por una modificación del método propuesto por Morris (34), consistente en la eliminación de fenoles en una columna de polivinil pirrolidona y adsorción del ácido indolacético en otra columna de DEAE-Celulosa.
- Los resultados que se obtuvieron indican que en las tres variedades de maíz el contenido de ácido indolacético disminuye al aumentar la maduración de los granos. La variedad que en el estado lechoso presentó un contenido mayor de ácido indolacético fue la H-139.

El hecho de que el contenido de ácido indolacético disminuya al aumentar el grado de maduración, indica una variación normal del contenido de ácido indolacético en las variedades de maíz estudiadas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Routhchenko W. (1972). Causes de la germination sur plante de grain immatures de maïs. Ann Agron 23 (4): 445-459.
- 2.- CP-UNAM informe sobre la reunión de germinación prematura se semillas. Chapingo, México. 9-septiembre-1980.
- 3.- Wilkins M.B. (1969). Physiology of Plant Grow & Develop ment. McGraw-Hill. London. pags.: 15, 28, 605-644.
- 4.- Mayer A.M. (1974). Control of seed germination. Ann Rev Plant Physiol. 25: 167-193.
- 5.- Chen S.S.C. (1973). Hormones and seed dormancy. Seed Sci & Technol. 1: 325-338.
- 6.- Thimann K.V. (1974). Fifty years of plant hormone research. Plant Physiol. 54: 450-453.
- 7.- Fountain D.W. (1976). Lettuce seed germination. Modulation of pregermination protein synthesis by gibberellic acid, abscisic acid and cytokinin. Plant Physiol. 58: 520-536.
- 8.- Paleg L.G. (1960). Physiological effects of gibberellic acid: I. On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. Plant Physiol. 35: 293-299.
- 9.- Jacobsen J.B. (1982). Characterization of the α -amylases synthesized by aleurone layers in response to gibberellic acid. Plant Physiol. 70: 1647-1653.
- 10.- Upandhyaya M.K. (1981). Leveles of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases in the embryos and endosperms of some dormant and nondormant lines of *Avena fatua* during germination. Can J. Bot. 59 : 1640-1646.
- 11.- Goleniowski M.E. (1976) Efecto del ácido abscísico so bre la germinación de *Eragrostis curvula*. Interacción con otros reguladores del crecimiento y sus efectos sobre di ferentes enzimas. EYTON 34 (2) : 169-177.

- 12.- Glinka Z.L. (1971). Abscisic acid raises the permeability of plant cells to water. *Plant Physiol.* 48: 103-105.
- 13.- Schöpfer F. (1979). Control of seed germination by abscisic acid. *Plant Physiol.* 64: 822-827.
- 14.- Dunlap J.R. (1977). Reversal of induced dormancy in Lettuce by ethylene, kinetin, and gibberellic acid. *Plant Physiol.* 60 : 222-224.
- 15.- Ketring D.L. (1969). Ethylene as a component of the emanations from germinating Peanut seeds and its effect on dormant Virginia-type seeds. *Plant Physiol* 44: 326-330.
- 16.- Eastwell K.C. (1982). Modes of ethylene action in the release of α -amylase through cell walls of barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 69: 563-567.
- 17.- Ho T.D. (1982). Effect of ethylene on the release of α -amylase through cell walls of barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 69 : 1128-1131.
- 18.- Tilberg E. (1977). Indolacetic acid levels in Phaseolus, Zea and Pinus during seed germination. *Plant Physiol.* 60: 317-319.
- 19.- Khan A.A. (1971). Cytokinins : permissive role in seed germination. *Science* 171 : 853-859.
- 20.- Bandurski R.S. (1977) Photoregulation of the ratio of ester to free indole-3-acetic acid. *Biochem Biophys Res Comm.* 79 : 1219-1223.
- 21.- Cohen J.D., Bandurski R.S. (1982). Chemistry and physiology of the bound auxins. *Ann Rev of Plant Physiol.* 33: 403-430.

- 22.- Epstein E. (1980). Concentration and metabolic turnover of indoles in germinating kernels of *Zea mays* L. *Plant Physiol* 65 : 415-421.
- 23.- Félix R. (1981). Tesis de maestría en ciencias. Germinación prematura de maíz en México. Colegio de Posgraduados. Chapingo, México.
- 24.- Eeuwens C.J. (1975). Seed and pod wall development in *Pisum sativum*, L. in relation to extracted and applied hormones. *J. Exp Bot.* 26 (90) : 1-14.
- 25.- Sweetser P.B. (1978). Indole-3-acetic acid levels of plant tissue as determined by a new high performance liquid chromatographic method. *Plant Physiol* 61: 254-258
- 26.- McDougall J. (1978). Analysis of indole-3-acetic acid using gas chromatography-mass spectrometry techniques. In isolation of plant growth substance, J.R. Hillman Cambridge University Press. London-New York-Melburne.
- 27.- Allen J.R.P. (1982). Quantification of indol-3-yl acetic acid in pea and maize seedlings by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiol.* 69 : 950-956.
- 28.- Durley R.C. (1978). Analysis of abscisins and 3-indoly-acetic acid in leaves of *Sorghum bicolor* by high performance liquid chromatography. *Can J Bot.* 56: 157-161.
- 29.- Rittenberg K. (1940). A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution with application to the determination of amino acids and fatty acids. *J. Biol Chem.* 133 : 737-744.
- 30.- Stoessl A. (1970). Determination of submicrogram levels of indole-3-acetic acid : A new, highly specific method. *Anal Biochem* 34 : 344-351.

- 31.- Plieninger H. (1964). Indolo- α -pyrone und indolo- α -pyridone. Chem Ber 97 : 667-681.
- 32.- Eliasson L. (1976). Reliability of the indolo- α -pyrone fluorescence method for indole-3-acetic acid determination in crude plant extracts. Physiol plant 36 : 16-19.
- 33.- Iino M. (1980). Improved procedure for the estimation of nanogram quantities of indole-3-acetic acid in plant extracts using the indolo- α -pyrone fluorescence method. Plant Physiol. 66 : 1099-1105.
- 34.- Morris R.O. Comunicación Personal.
- 35.- Rousser G. (1969). Diethylaminoethyl and triethylaminoethyl cellulose column chromatographic procedures for phospholipids, glycolipids and pigments. Methods in enzymology XIV : 272-300.
- 36.- Hemberg T. (1980). The influence of the extraction procedure on yield of indole-3-acetic acid in plant extracts. Physiol Plant. 50 : 176-182.
- 37.- Tomaszewski M. (1966). Interactions of Phenolic acids, Metallic ions and Chelating agents on auxin-induced growth. Plant Physiol. 41 : 1443-1454.
- 38.- Bandurski R.S. (1977). Concentration of indole-3-acetic acid and its derivatives in plants. Plant Physiol. 60: 211-213.
- 39.- Loomis W.D. (1966). Plant Phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochem. 5 : 423-438.

- 40.- Gleen J.L. (1972). Use of insoluble polyvinylpyrrolidone for purification of plant extracts and chromatography of plant hormones. *Phytochem.* 11 : 345-351.
- 41.- Andersen R.A. (1968). Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinylpyrrolidone. *Phytochem.* 7 : 293
- 42.- Iino M. (1982). Estimation of free, conjugate, and diffusible indole 3 acetic acid in etiolated maize shoots by the indolo- α -pyrone fluorescence method. *Plant Physiol.* 69 : 950-956
- 43.- CP-UNAM Informe de actividades 1979-1983. agosto 1983.