



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA

Casa abierta al tiempo

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

C. A. M. ZITAPALAPA, D.F. 06070

GALACTOMANANO COMO UNA FUENTE DE CARBONO DURANTE  
EL DESARROLLO, GERMINACIÓN Y POSTGERMINACIÓN DE LA  
SEMILLA *Ipomoea purpurea* (L.) ROTH.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

BIOL. EXP. SILVERIO GARCÍA LARA

MÉXICO, D.F.

JUNIO DE 1998



La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa se encuentra dentro del Padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, según No de registro 309-0

Mi total reconocimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante la realización de la maestría, a través de la beca número 95352, durante el periodo de enero de 1996 a diciembre de 1997.

Mi total agradecimiento a la Fundación Teléfonos de México (TELMEX), por el apoyo económico brindado con la beca 3150003307, durante el periodo de octubre de 1997 a septiembre de 1998, con la cual se llevo a termino la presente tesis.

---

---

**Dedico esta tesis a:**

MI MADRE :

Sra. María Isabel Lara Esquivel

Por inculcarme los principios, valores y virtudes que dirigen y definen mi vida, por sembrar en mi la semilla más valiosa: el amor, y por enseñarme con su ejemplo que todo en la vida es posible con dedicación y fe.

M I S H E R M A N O S :

Gregorio, Matilde, Juan Antonio, Luis Manuel y María de los Angeles.

Por su invaluable apoyo y cariño en los momentos mas importantes de mi vida.

MI NOVIA:

Sofía Ortíz Islas.

Con todo el amor que un hombre puede profesar a una mujer.

MI EQUIPO:

XOΣMOΣ.

Donde quiera que el universo decida reunirnos, ahí estaré

IN MEMORIAN DE:

Mi padre: Juan García Paredes

Mi abuelo: Gregorio García Espinosa

---

---

## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Director de esta tesis:

Dr. David Díaz Pontones

Por enseñarme el valor de la ciencia y de los hombres que hacen ciencia. Por su amistad, apoyo y confianza brindados.

A los Asesores de esta tesis:

Dra. María Luisa Ortega Delgado, Dra. Marina Gavilanes Ruíz y Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco, por sus estimables sugerencias y apoyo en la realización de la investigación y revisión del manuscrito. Por poner a mi alcance su vasta experiencia en la investigación, sin las cuales no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Al Comité de la Maestría en Biología Experimental.

De manera especial a la Dra. Ma. Concepción Gutierrez Ruíz y al Maestro Joaquín Herrera Muñoz por sus valiosos consejos y su decidido apoyo en todo momento.

---

## INDICE GENERAL

Indice General	I
Indice de Figuras	III
Indice de Tablas	V
Abreviaturas	VI
I.- Resumen	1
II.- Introducción	3
III.- Antecedentes	4
A.- Arvenses	5
B.- Desarrollo de semillas en angiospermas	5
C.- Desarrollo de semillas de la familia Convolvulecea	7
D.- Carbohidratos de reserva en semillas de angiospermas	8
1.- Almidón	9
2.- Galactomanano	10
2.1.- Usos	12
E.- Fisiología del desarrollo del endospermo	13
F.- Germinación de semillas en angiospermas	14
G.- Germinación en Convolvulaceas	15
H.- Movilización de carbohidratos durante la germinación y postgerminación	16
I.- Fisiología de la postgerminación: el papel del endospermo	17
IV.- Justificación	19
V.- Objetivos	20
VI.- Metodología	21
A.- Material biológico	22
B.- Desarrollo de semillas	22
C.- Germinación de semillas	22
D.- Extracción de carbohidratos solubles	22
E.- Cuantificación de carbohidratos solubles totales	24
F.- Determinación de carbohidratos solubles por pruebas químicas	24
G.- Cuantificación de Gal y nRaf por pruebas enzimáticas	24
H.- Determinación del tipo de $\alpha$ -galactosil oligosacárido	24
I.- Cuantificación de Sac, Glu y Fru por pruebas enzimáticas	24
J.- Extracción y cuantificación de GLM	27
K.- Pureza del GLM	27
L.- Extracción y cuantificación de Alm	27
M.- Extracción y cuantificación de actividades enzimáticas	
1.- $\alpha$ -Galactosidasa y $\beta$ -Manosidasa	30
2.- $\beta$ -Mananasa	32
N.- Extracción y cuantificación de la actividad amilolítica	32
VII.- Resultados	36
A.- Cuantificación de carbohidratos.	

1.- Durante el desarrollo de <i>Ipomoea purpurea</i> .	
a.- Desarrollo de la semilla.	37
b.- Carbohidratos .	37
2.- Durante la germinación y postgerminación de <i>Ipomoea purpurea</i> .	
a.- Germinación de la semilla.	45
b.- Carbohidratos.	47
B.- Determinación de las actividades enzimáticas.	
1.- Durante el desarrollo de <i>Ipomoea purpurea</i> .	
a.- $\alpha$ -Galactosidasa y $\beta$ -Manosidasa.	52
b.- $\beta$ -Mananasa.	55
2.- Durante la germinación y postgerminación de <i>Ipomoea purpurea</i> .	
a.- $\alpha$ -Galactosidasa y $\beta$ -Manosidasa.	56
b.- $\beta$ -Mananasa.	60
c.- Actividad amilolítica.	63
VIII.- Discusión.	65
A.- Desarrollo de la Semilla <i>Ipomoea purpurea</i>	66
B.- Carbohidratos durante el desarrollo de la Semilla.	66
C.- Carbohidratos durante la germinación y postgerminación.	69
D.- Enzimas hidrolíticas durante el desarrollo.	71
E.- Enzimas hidrolíticas durante la germinación y postgerminación	73
F.- Actividad amilolítica durante la germinación y postgerminación.	77
G.- Modelo de movilización de carbono en <i>Ipomoea purpurea</i>	78
IX.- Conclusiones	82
X.- Perspectivas	83
XI.- Bibliografía	84

## INDICE DE FIGURAS

1a-	Diagrama del método de extracción de carbohidratos solubles	23
1b-	Diagrama del método de cuantificación de carbohidratos reductores totales por antrona	25
1c-	Diagrama del método para cuantificar galactosa y $\alpha$ -galactosil oligosacárido por pruebas enzimáticas	26
1d-	Diagrama del método para cuantificar sacarosa, glucosa y fructosa por pruebas enzimáticas	26
1e-	Diagrama del método de extracción y cuantificación de galactomanano	28
1f-	Diagrama del método de extracción y cuantificación de almidón	29
2a-	Diagrama del método de extracción y cuantificación de la actividad de $\alpha$ -galactosidasa y $\beta$ -manosidasa.	31
2b-	Diagrama del método de extracción y cuantificación de la actividad de $\beta$ -mananasa.	33
2c-	Diagrama del método de extracción y cuantificación de la actividad amilolítica	34
3-	Cuantificación total de carbohidratos reductores por el método de antrona durante el desarrollo de la semilla <i>Ipomoea purpurea</i> .	37
4-	Cantidad de glucosa durante el desarrollo de la semilla <i>Ipomoea purpurea</i> .	39
5-	Cantidad de fructosa durante el desarrollo de la semilla <i>Ipomoea purpurea</i> .	40
6-	Cuantificación de $\alpha$ -galactosil oligosacárido durante el desarrollo de la semilla <i>Ipomoea purpurea</i> .	41
7-	Cantidad de galactosa durante el desarrollo de la semilla <i>Ipomoea purpurea</i> .	42
8-	Cantidad de sacarosa durante el desarrollo de la semilla <i>Ipomoea purpurea</i> .	43
9-	Cuantificación de galactomanano durante el desarrollo de la semilla <i>Ipomoea purpurea</i> .	44
10-	Resumen de carbohidratos durante el desarrollo de la semilla <i>Ipomoea purpurea</i> .	45
11-	Determinación del peso fresco durante la germinación y postgerminación de <i>Ipomoea purpurea</i> .	46
12-	Determinación del peso seco durante la germinación y postgerminación de <i>Ipomoea purpurea</i> .	46
13-	Determinación de la longitud de la radícula durante la postgerminación de <i>Ipomoea purpurea</i> .	47
14-	Cuantificación de $\alpha$ -galactosil oligosacárido en embrión durante la germinación y postgerminación de <i>Ipomoea purpurea</i> .	48
15-	Cuantificación de galactomanano en endospermo durante la germinación y postgerminación de la semilla <i>Ipomoea purpurea</i> .	48
16-	Cantidad de galactosa en embrión durante la germinación y postgerminación de <i>Ipomoea purpurea</i> .	49
17-	Cantidad de sacarosa en embrión durante la germinación y postgerminación de <i>Ipomoea purpurea</i> .	49
18-	Cantidad de almidón en embrión durante la germinación y postgerminación de <i>Ipomoea purpurea</i> .	50

- 19- Cantidad de glucosa en embrión durante la germinación y postgerminación de 50  
*Ipomoea purpurea*.
- 20- Cantidad de fructosa en embrión durante la germinación y postgerminación de 51  
*Ipomoea purpurea*.
- 21- Resumen de carbohidratos durante la germinación y postgerminación de la 51  
semilla *Ipomoea purpurea*.
- 22- Resumen de carbohidratos durante el desarrollo, desecación, germinación y 52  
postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*.
- 23- Cambios en la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa durante el desarrollo de la semilla 53  
*Ipomoea purpurea*.
- 24- Comparación de la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa por estructura durante el 54  
desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*.
- 25- Cambios en la actividad de  $\beta$ -manosidasa durante el desarrollo de la semilla 54  
*Ipomoea purpurea*.
- 26- Comparación de la actividad de  $\beta$ -manosidasa por estructura durante el 55  
desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*.
- 27- Cambios en la actividad de  $\beta$ -mananasa durante el desarrollo de la semilla 55  
*Ipomoea purpurea*.
- 28- Cambios en la actividad de enzimas hidrolíticas de GLM durante el desarrollo 56  
de la semilla *Ipomoea purpurea*.
- 29- Cambios en la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa durante la germinación y 57  
postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*.
- 30- Cambios en la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa extraída a pH 8.0 durante la 58  
germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*.
- 31- Cambios en la actividad de  $\beta$ -manosidasa durante la germinación y 59  
postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*.
- 32- Cambios en la actividad de  $\beta$ -manosidasa extraída a pH 8.0 durante la 60  
germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*.
- 33- Cambios en la actividad de  $\beta$ -mananasa durante la germinación y 61  
postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*.
- 34- Cambios en la actividad de enzimas hidrolíticas de GLM durante la 61  
germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*.
- 35- Cambios en la actividad de enzimas hidrolíticas de GLM durante el desarrollo, 62  
desecación, germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*.
- 36- Cambios en la actividad amilolítica soluble del embrión durante la germinación 63  
y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*.
- 37- Cambios en las proporciones glucosa/fructosa durante el desarrollo de la 68  
semilla *Ipomoea purpurea*.
- 38- Esquema de movilización de carbohidratos durante el desarrollo de la semilla 80  
*Ipomoea purpurea*
- 39 Esquema de movilización de carbohidratos durante la germinación y 81  
postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*

## INDICE DE TABLAS

---

Tabla 1 Pruebas de identificación para carbohidratos (monosacáridos) en GLM de la semilla <i>Ipomoea purpurea</i> .	38
Tabla 2 Análisis de correlación entre las pozas de carbohidratos durante el desarrollo germinación y postgerminación de la semilla <i>Ipomoea purpurea</i>	71
Tabla 3 Análisis de correlación entre las actividades enzimáticas y GLM durante la germinación y postgerminación de la semilla <i>Ipomoea purpurea</i> .	74
Tabla 4 Análisis de correlación entre la actividad enzimática por estructura y GLM durante la germinación y postgerminación de la semilla <i>Ipomoea purpurea</i>	76

## INDICE DE ABREVIATURAS

---

Alm = almidón  
a-GLT o  $\alpha$ -GLT =  $\alpha$ -galactosidasa  
b-MNN o  $\beta$ -MNN =  $\beta$ -mananasa  
b-MSD o  $\beta$ -MSD =  $\beta$ -manosidasa  
EMB = embrión  
END = endospermo  
Equiv. de Gal = equivalentes de galactosa  
Fru = fructosa  
Gal = galactosa  
GLM = galactomanano  
Glu = glucosa  
Imb = imbibición  
mg-pf = miligramos de peso fresco  
PNPG = p-nitrofenil-  $\alpha$ -D-galactopiranosido  
PNPM = p-nitrofenil-  $\beta$ -D-manopiranosido  
nRaf =  $\alpha$ -galactosil oligosacárido (serie de la rafinosa)  
Sac = sacarosa  
HPTLC = cromatografía de placa fina de alta resolución  
TES = testa

*Ipomoea purpurea* es una arvense que causa serios daños a cultivos básicos en México. Se ha demostrado que la invasión de esta maleza causa bajas en el rendimiento de hasta un 33% en maíz y frijol. Se ha establecido que las ventajas adaptativas presentes en esta semilla, se deben a los eventos que se presentan durante el desarrollo. Una de estas adaptaciones es la acumulación de sustancias de reserva, las cuales pueden utilizarse durante la germinación y establecimiento de la plántula. Se ha demostrado que existe una acumulación transitoria de almidón (Alm) a nivel de la cubierta seminal, así como la presencia en otras especies de galactomanano (GLM) en el endospermo. De lo anterior deriva la importancia de estudiar la biosíntesis y degradación de GLM, así como el estudio de las pozas de carbohidratos solubles que se presentan en semillas de *Ipomoea purpurea* (L) Roth, desde la anthesis hasta la semilla madura hidratada y de la semilla madura deshidratada hasta las 72 horas de imbibición.

Los resultados obtenidos indican que durante el desarrollo de la semilla se acumulan carbohidratos solubles. Así, la glucosa (Glu) tiene un máximo de acumulación hacia la mitad del desarrollo, y se localizó principalmente en la testa. La fructosa (Fru) se mantiene constante durante el desarrollo, descendiendo en la testa y acumulándose en el endospermo y embrión. Con respecto a la sacarosa (Sac), ésta se acumula únicamente hacia el final del desarrollo en las tres estructuras. La cantidad de galactosa (Gal) y  $\alpha$ -galactosil oligosacárido (nRaf) se mantienen en cantidades traza. A nivel del endospermo se encontró que se acumula GLM a partir de la mitad del desarrollo. Durante la germinación y postgerminación se encontró que existe un aumento en el peso fresco y la longitud de radícula con relación al tiempo de imbibición; sin embargo, el peso seco se mantiene constante. Durante la fase de germinación (0-24 hrs) se encontró que los nRaf localizados únicamente en el embrión se consumen. En la postgerminación de la semilla (24-48 hrs), el GLM se consume totalmente y aparecen a nivel del embrión pozas transitorias de Sac y Alm junto con el inicial aumento de Glu y Fru. En la última fase de estudio (48-72 hrs) descienden las pozas de Sac y Alm y se acumulan Glu y Fru en el embrión.

Con respecto a las enzimas involucradas en la degradación de GLM, durante el desarrollo la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa se incrementa principalmente en el embrión mientras que la actividad de  $\beta$ -manosidasa se incrementa en el embrión y endospermo. A nivel de la testa se detecta una actividad baja de  $\beta$ -mananasa. Durante la germinación y postgerminación la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -mananasa a nivel del endospermo se incrementan conforme el GLM desaparece, sin embargo la actividad de la  $\beta$ -manosidasa disminuye paralelamente con el GLM. En el embrión la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa aumenta y al parecer está relacionada con la desaparición del  $\alpha$ -galactosil oligosacárido, la actividad  $\beta$ -mananasa también aumenta y puede estar relacionada con la protrusión de la radícula. La actividad de la  $\beta$ -manosidasa se mantiene constante y al parecer está relacionada con la degradación de manoligosacáridos. Por último la actividad amilolítica en la plántula aumenta conforme el ALM desaparece.

De lo anterior se concluye que en semillas de *Ipomoea purpurea*, el GLM es el polisacárido de reserva de mayor importancia, el cual se acumula durante el desarrollo en el endospermo y se utiliza durante la postgerminación para el establecimiento de la plántula.

La acumulación de GLM está asociada al aporte de carbono de la planta madre la cual puede ser en forma de Sac y pozas acumulables de Glu, Fru y Gal a nivel del endospermo. Por otro lado la desaparición de la poza de GLM esta asociado a la actividad de la enzimas  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa y a la producción de pozas transitorias de Sac y Alm en el embrión, así como a la acumulación de Glu y Fru en la postgerminación. En futuras investigaciones es necesario indagar acerca de las señales que controlan la síntesis y degradación de GLM así como determinar el papel específico del GLM en la protección del embrión y en la nutrición de la nueva plántula. Se espera que este conocimiento permita evaluar y seleccionar métodos de control de la arvense y se considere como fuente alternativa de obtención de GLM para la industria en México.

La creación de las diversas culturas se ha vinculado a las semillas. Estas han sido por muchos años sujeto de estudio, debido a la necesidad urgente de comprender su biología. La importancia de desarrollar trabajos en este sentido, está gobernada por la creciente demanda de éstas para la producción de alimentos, fibras, brebajes, especies, aceites industriales, materias primas, vitaminas y drogas entre otros. A partir de los estudios realizados en semillas de importancia para el hombre, se han podido conocer varios aspectos de su anatomía, fisiología y bioquímica, pero faltan aún por conocer muchos aspectos como son los mecanismos de almacenamiento, movilización y transformación de las sustancias de reserva y la diferenciación y organogénesis del embrión.

En la actualidad existe un gran interés en el estudio de las semillas para el consumo humano y en la obtención de materias primas de uso industrial. Este interés ha dado lugar a la generación de conocimientos a diversos niveles, que en conjunto ha permitido obtener variedades de cultivos resistentes a diversos factores ambientales y enfermedades, así como lograr una alta eficiencia en su producción agrícola. Sin embargo, otro aspecto importante son las semillas de las malezas que invaden los cultivos, cuyos daños pueden incidir de manera directa e indirecta en la producción y rendimientos de los mismos.

Se ha demostrado que la invasión de malezas del género *Ipomoea* en cultivos básicos en México, causan serios decrementos en la producción cuando no se controlan en los períodos de establecimiento de las plántulas. Particularmente la arvense *Ipomoea purpurea* causa bajas en el rendimiento de 24 % en maíz y 33% en frijol en promedio (Agundis, 1984).

Los estudios realizados en esta arvense ha permitido comprender que muchos de las ventajas adaptativas que le permiten competir exitosamente con los cultivos, se deben a los eventos que se presentan durante el desarrollo de la semilla (Díaz-Pontones *et al.*, 1992). Dentro de estos mecanismos de adaptación se encuentra la acumulación de sustancias de reserva, las cuales se podrán utilizar posteriormente durante la germinación y establecimiento de la plántula. Se ha demostrado que existe una acumulación transitoria de almidón a nivel de la cubierta seminal (Díaz-Pontones *et al.*, 1992), así como la presencia en otras especies de la familia Convolvulacea, de un polisacárido del tipo de las hemicelulosas (galactomanano) en el endospermo (Brechú-Franco *et al.*, 1984). De lo anterior deriva la importancia de estudiar los patrones de acumulación, posible transformación y utilización de los carbohidratos de reserva en esta semilla, por lo que el objetivo del presente proyecto está dirigido al estudio del galactomanano, de pozas de carbohidratos solubles y enzimas hidrolíticas que se presentan durante el desarrollo, germinación y postgerminación en semillas de *Ipomoea purpurea* (L) Roth.

La generación de este conocimiento permitirá comprender cuál es la reserva de carbohidratos que utiliza esta semilla como estrategia de adaptación. En un futuro se esperan encontrar diferencias entre los cultivares y esta maleza que permitan su control, y de manera indirecta, la posible utilización de esta semilla en la industria.

III.- ANTECEDENTES

A.- Arvenses

B.- Desarrollo de semillas en angiospermas

C.- Desarrollo de semillas de la familia Convolvulaceae

D.- Carbohidratos de reserva en semillas de angiospermas

1.- Almidón

2.- Galactomanano

2.1.- Usos

E.- Fisiología del desarrollo del endospermo

F.- Germinación de semillas en angiospermas

G.- Germinación en Convolvulaceae

H.- Movilización de carbohidratos durante la germinación y postgerminación

I.- Fisiología de la postgerminación: el papel del endospermo

**A.- Arvenses.**

Las arvenses se definen como aquellas plantas que causan daños considerables al desarrollo del cultivo con el cual compiten y que a su vez constituyen uno de los problemas de mayor importancia en la agricultura. En el grupo de las arvenses se encuentra el género *Ipomoea*, dicotiledónea que pertenece a la familia Convolvulaceae. Una especie de importancia es *Ipomoea purpurea* conocida también como “campanita” o “manto de la virgen”. *I. purpurea* es una enredadera nativa del trópico americano, con una alta distribución mundial como planta ornamental, pero que al escapar de las condiciones controladas se le ha referido como una maleza (Flores, 1970). *I. purpurea* es una mala hierba que se encuentra en cultivos básicos para la alimentación humana como es el maíz y el frijol (entre 40 cultivos más). En el caso particular del cultivo de maíz se ha detectado invasión en distintas zonas de México (Aguilar y Acosta, 1975).

La intensidad de los daños que las malas hierbas ocasionan a los cultivos, dependen de varios factores, como: el tiempo en que se mantiene la libre competencia con el cultivar, el tipo de especies que invaden, las densidades de población, la época de emergencia de las malas hierbas en relación con la de los cultivos y los sistemas de siembra prevalecientes, entre otros. *I. purpurea* ocasiona un decremento en la producción del cultivo que invade, hasta de un 33% cuando no se controla durante los primeros días. En el caso del maíz, la competencia en este período, ocasiona plantas cloróticas de poco vigor y altura, y las reducciones en los rendimientos alcanzan un 24 % promedio; sin embargo, las pérdidas se incrementan severamente cuando los períodos de competencia se extienden, o bien cuando la maleza emerge antes que el cultivar y su densidad de población es alta, en cuyo caso las pérdidas alcanzan el 73 %. En el frijol, el promedio de reducción en la productividad es de un 33 %, como consecuencia de los daños ocasionados por la competencia y alcanza hasta un 82 % durante todo el ciclo (Agundis, 1984).

*I. purpurea* posee ventajas adaptativas muy marcadas que le permiten competir exitosamente con otras plantas (cultivos); estas ventajas se reflejan en la producción de una gran cantidad de semillas que llegan a la madurez, una alta viabilidad, prolongada longevidad, una cubierta seminal impermeable al agua, y una rápida germinación (Brechú-Franco *et al.*, 1991). Todas estas características se encuentran en relación con los fenómenos que ocurren durante el desarrollo de la semilla, incluyendo la acumulación de sustancias de reserva (Díaz-Pontones *et al.*, 1992).

**B.- Desarrollo de Semillas en Angiospermas**

Una semilla verdadera se origina de un óvulo con una ovocélula la cual es fecundada y llega a la madurez originando un embrión y un alto contenido de nutrimentos almacenados, con el tegumento o tegumentos diferenciados como una cubierta protectora o testa (Esau, 1985).

Las semillas de las angiospermas varían ampliamente en su estructura, pero ésta es relativamente constante en grupos pequeños. Sin embargo, los eventos iniciales que siguen a la fertilización son similares entre ellos. El polen germina sobre el estigma para formar el

tubo polínico, el cual penetra en el estilo y transporta a dos núcleos espermáticos hacia el saco embrionario. Uno de los núcleos fecunda a la célula huevo formando el cigoto ( $2n$ ). El segundo núcleo espermático se fusiona con la célula central y se une a los dos núcleos polares para formar el endospermo primario ( $3n$ ). El subsecuente desarrollo del cigoto y el endospermo difiere considerablemente en los grupos de plantas. En semillas de dicotiledóneas, la división del cigoto da una célula apical y una basal, el suspensor se forma principalmente por los derivados de la célula basal, o por ésta y algunas células originadas de la apical; mientras que el embrión deriva de la célula apical. En monocotiledóneas, el embrión y algunas de las células del suspensor son producto de la célula apical (Bewley y Black, 1985). Los embriones de las dicotiledóneas y las de las monocotiledóneas pueden ser de forma similar hasta la fase en que el cuerpo principal del embrión tiene la forma globular. Posteriormente, el embrión de las dicotiledóneas adquiere la forma de corazón, debido a la aparición de dos cotiledones, mientras que en monocotiledóneas se transforma en una estructura con un solo cotiledón (Esau, 1985).

El endospermo verdadero está constituido por las células triploides o poliploides y es un tejido característico de angiospermas. Existen tres tipos de desarrollo de endospermo: nuclear, celular y helobial. En el endospermo nuclear, los núcleos se forman por divisiones nucleares libres y las paredes celulares aparecen más tarde. En el endospermo celular, la formación de la pared celular ocurre con la primera mitosis y continúa a lo largo del desarrollo del endospermo (no existe la fase nuclear libre). En el endospermo helobial, el saco embrionario está dividido en dos células de longitud diferente. La más grande (la chalazal), se desarrolla de manera nuclear y la más pequeña (micropilar) muestra un comportamiento variable. El endospermo está asociado a la disponibilidad de fuentes de nutrimentos para el desarrollo y/o maduración del embrión; en semillas de dicotiledóneas no endospermicas, éste se consume y las reservas al final del desarrollo se encuentran principalmente en los cotiledones, las cuales son utilizadas por el embrión durante la germinación. En semillas dicotiledóneas endospermicas, como algunas leguminosas, el endospermo se retiene como un tejido de almacenamiento conteniendo una capa de células vivas denominada aleurona (Bewley y Black, 1985; Esau, 1985).

Los tegumentos del óvulo se reorganizan durante el desarrollo de la semilla para formar la cubierta seminal o testa, la cual es extremadamente diferente entre las especies, variando el grado de diferenciación, el número y grosor de los estratos, así como los patrones de vascularización. La cubierta de la semilla protege al embrión, sin embargo, los aspectos de esta protección varían en complejidad. Muchas de las cubiertas seminales parecen estar involucradas en el control de la germinación, restringiéndola a los períodos más favorables para el desarrollo de la plántula. Algunos de los factores involucrados en la inhibición de la germinación son un alto grado de impermeabilidad de la testa al agua, al oxígeno y bióxido de carbono, además de la dureza que afecta de manera mecánica el crecimiento del embrión. Estos efectos son producto de la existencia de capas cuticulares y la distribución de los compuestos fenólicos que se han localizado en la testa y que parecen contribuir a la impermeabilidad de ésta al agua y al oxígeno (Esau, 1985; Ponce-Salazar *et al.*, 1993).

### C.- Desarrollo de Semillas de la Familia Convolvulaceae

Las semillas de la familia Convolvulacea se encuentran en un fruto capsular, que presentan un ovario supero bi o tricarpelar, con uno, dos o tres lóculos conteniendo dos óvulos unitégmicos, anátropos erectos sobre placentas axiales. El primordio del óvulo se desarrolla como una protuberancia que nace de la placenta. En seguida, la parte terminal se curva con respecto al eje, la cual formará la región chalazal del óvulo. Es en esta etapa que en la base del tegumento surge la nucela. El extremo micropilar, por lo tanto se encuentra frente a la región placentaria (óvulo anátropo). La superficie de la semilla puede ser lisa, rugosa, glaba o pubescente (Govil, 1971).

En algunos géneros de Convolvulaceas se han hecho estudios sobre el desarrollo de la semilla (Sripleng y Smith, 1960; Kaur y Singh, 1970; Govil, 1971). La descripción del proceso en *Ipomoea sinuta*, *Ipomoea purpurea*, *Ipomoea carnea* y *Convolvulus arvensis* ilustran la transformación del óvulo fertilizado a la semilla madura dentro de esta familia. El desarrollo de la cubierta seminal comienza en el momento de la fertilización; el tegumento posee de quince a veinte células de grosor de tipo parenquimatoso, rodeadas por una capa de células protodérmicas. A los cinco días después de la fertilización se pueden reconocer cuatro capas de células. La capa más externa o epidermis deriva de la protodermis, y consiste en células grandes y vacuoladas. La capa subepidérmica que se deriva de la hipodermis, que a su vez proviene de la división de la protodermis, consiste de células pequeñas con pocas vacuolas y núcleos grandes. Una tercera capa que se deriva de la hipodermis y que tiene de uno a tres estratos son las células de esclerénquima en empalizada. La cuarta capa consiste de quince estratos de células parenquimatosas. En la segunda semana de fertilización, las capas están claramente definidas. Las células parenquimatosas bajo el tejido en empalizada, cesan de dividirse y acumulan grandes cantidades de almidón (Díaz-Pontones *et al.*, 1992). Quince o veinte días después de la fertilización, la epidermis, la subepidermis y la capa en empalizada engruesa sus paredes celulares. La subepidermis, además, se impregna con lignina y cutina o suberina, capa que se ha propuesto que es responsable de la impermeabilidad de la cubierta seminal. A los 25 días, el parénquima es degradado y en la madurez queda sólo un estrato cuticular de paredes celulares comprimidas, que separan al endospermo de la capa de esclerénquima. La maduración de la cubierta seminal ocurre aproximadamente a los treinta días. En ella se pueden distinguir tres regiones, la primera es una región entre el micrópilo y el funículo, formando el cojincillo; la segunda es una región entre el funículo y la chalaza y la tercera que forma la mayor parte de la cubierta seminal (López-Curto *et al.*, 1990).

La embriogénesis de las especies antes citadas siguen el mismo plan básico. La primera división del cigoto, que es transversal, origina una célula apical y una basal. La célula basal se divide verticalmente u oblicuamente y la célula apical, transversalmente. Las células que se han derivado de la célula terminal, sufren subsecuentes divisiones promoviendo la formación de un proembrión. A los 10 días de desarrollo se observa un embrión en etapa de corazón con un suspensor y los primordios de los cotiledones. Cuando el embrión llega a una edad de entre 15 y 20 días ( etapa de torpedo) acelera su crecimiento,

los cotiledones se alargan, se observa la aparición del procambium tanto en el cuerpo del embrión como en los cotiledones, y la presencia de un epicotilo y del hipocotilo.

En la semilla madura, el eje epicotilo-hipocotilo es más corto que los cotiledones, estos últimos presentan la forma de la hoja doble plegada. Alrededor de los 24 días de desarrollo se observa que los cotiledones ocupan un gran volumen dentro de la semilla y en algunos casos aparecen laticíferos (*I. purpurea*). En la semilla madura hidratada se tienen los cotiledones grandes y plegados, mientras que el endospermo ocupa un menor volumen (Díaz-Pontones *et al.*, 1992).

En el desarrollo del endospermo en *C. arvensis*, aproximadamente a los cinco días después de la fertilización aparece en el saco embrionario una línea periférica de citoplasma denso conteniendo una gran cantidad de núcleos (endospermo de tipo nuclear). En el extremo antipodal del saco embrionario, los núcleos se dividen más frecuentemente que aquellos del resto del endospermo. La división celular se inicia cerca del suspensor y progresa lentamente hacia el extremo antipodal. En el noveno día aproximadamente el endospermo llena el saco embrionario y es completamente celular, excepto en el extremo antipodal en donde la celularización ocurre hasta el día doce o trece después de la fertilización. Las células endospermicas en un principio son vacuoladas y tienen paredes celulares delgadas, cerca de los quince días después de la fertilización, el endospermo consiste de dos o tres zonas periféricas de células pequeñas rectangulares, que desarrollan progresivamente paredes celulares más gruesas, mientras que las células internas se vuelven más largas y vacuoladas. En el período de 20-25 días postantesis el endospermo es gradualmente degradado hasta que, en la semilla madura, sólo persisten de 2 a 6 estratos externos alrededor del embrión y las células internas se encuentran en varias etapas de degradación (Sripleng y Smith, 1960).

Se ha observado en semillas de otras familias que el endospermo está caracterizado por la presencia de una capa externa de células vivas llamada capa de aleurona. Cuando la semilla inicia su maduración, las células periféricas del endospermo comienzan a dividirse anticlinalmente formando células pequeñas rectangulares. Se pueden producir uno o más estratos de células de éste tipo, las cuales engruesan su paredes, desarrollan cuerpos proteicos, y lo más importante, permanecen vivas, a diferencia de las células internas del endospermo, las cuales almacenan polisacáridos en pared, pero que sin embargo mueren (Bewley y Black, 1978).

### **D.- Carbohidratos de Reserva en Semillas de Angiospermas.**

El desarrollo de la semilla implica una transferencia activa de sustancias de la planta madre a las nuevas estructuras de la semilla. Esta transferencia se realiza mediante el transporte de nutrimentos a través de los tejidos vasculares a la semilla y también mediante la degradación activa de tejidos (Esau, 1985).

Las semillas y el fruto se encuentran conectados al resto de la planta por el tejido vascular que comprende el xilema y el floema, vía por la cual son suministrados los solutos y el agua. Las fuentes de obtención de nutrimentos son principalmente las hojas foliares, raíces noduladas o no y la zona fotosintética del tallo. En el caso de los tejidos verdes, los

compuestos fotoasimilables son en un 90% traslocados a la semilla o fruto en forma de sacarosa, el resto pertenece a cantidades traza de monosacáridos y ácidos grasos. En cuanto a las raíces noduladas, las aminas de los aminoácidos sintetizados a éste nivel son del tipo de la asparagina y glutamina. En las raíces sin nodulos los ácidos alantóico y uréico, conjuntamente los nitratos y nitritos asimilados son traslocados a tejidos vegetativos o reproductivos donde son utilizados y/o transformados. En la hoja se localiza un alto nivel de azúcares, ácidos grasos y aminoácidos que son metabolizados en el mesófilo de la misma para obtener otros productos y sustentar el desarrollo del fruto y/o la semilla (Murray, 1988).

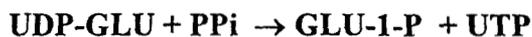
En los cereales, los carbohidratos que son almacenados tales como la sacarosa, glucosa, fructuosa, almidón y otros polisacáridos, alcanzan una concentración máxima en las parte vegetativas de la planta madre previamente a la antesis, después de la cual comienzan a decrecer. Parte de éstos carbohidratos son translocados durante el desarrollo de la semilla, lo que equivale de un 15 a 20% del peso fresco total de las semillas. La contribución restante depende de la actividad fotosintética de las diferentes partes de la planta madre durante el desarrollo. En leguminosas, la mayor parte del aporte de carbono a la semilla es fotosintetizado por tejidos verdes (como la vaina en el caso del chícharo), aunque existe una contribución importante por parte de las hojas. El incremento en el contenido de proteínas durante el desarrollo de la semilla, se da a expensas de las compuestos nitrogenados derivados de partes senescentes de la planta madre, o de la transformación a nivel de la hoja o bien proviene directamente de la fijación por los nódulos (Bewley y Black, 1985).

### 1.-Almidón.

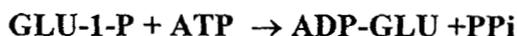
La sacarosa es el azúcar traslocado de la planta madre a la semilla y es el sustrato para la formación del almidón. Este almidón es sintetizado en hojas y almacenado en órganos como los frutos, semillas y raíces (Martin y Smith, 1995). La ruta de síntesis de almidón es bien conocida. Primeramente la sacarosa es convertida en fructosa y glucosa UDP por medio de la sacarosa sintetasa.



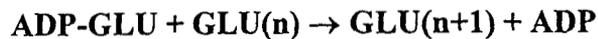
Ambos compuestos son convertidos a glucosa 1-fosfato por medio de la enzima UDP glucopirofosforilasa.



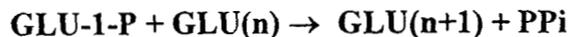
La glucosa-1-fosfato es convertida en ADP-glucosa por medio de la ADP-glucopirofosforilasa (ADPGPPasa; Ec 2.7.723. Nomenclatura Internacional para Enzimas).



Con ese compuesto se alargan las cadenas. Este proceso se repite para completar la molécula de almidón. La enzima involucrada es la ADP-glucosa almidón sintetasa (Ec 2.4.1.21).



Una forma alternativa de este paso lo realiza la enzima fosfatasa del almidón:



Las ramificaciones en los polímeros de almidón son reguladas por la enzima de ramificación del almidón (SBE; Ec 2.4.128), la cual hidroliza un enlace  $\alpha$ -(1,4) de una cadena y entonces cataliza la formación de un enlace  $\alpha$ -(1,6) entre el residuo terminal de la cadena del glucano "cortado" y otro residuo de glucosa (Martin y Smith, 1995).

El almidón está formado por dos componentes: amilosa (cadena lineal de glucosa con enlace  $\alpha$ -1,4) y la amilopectina (una cadena de glucosa ramificada con enlaces  $\alpha$ -1,6 glucosídicos), esta última constituye del 50 al 70% del polisacárido. El almidón es almacenado en organelos llamados amiloplastos, estos están rodeados por una doble membrana y posiblemente incorporen algunas enzimas de la síntesis del almidón. La síntesis de almidón parece comenzar después de la anthesis y se acumula en el endospermo de cereales junto a los cuerpos proteicos. En algunas leguminosas, el depósito del almidón se da en las células de los cotiledones a nivel del estoma de algunos cloroplastos, dos o tres semanas después de la anthesis. Un patrón distinto de acumulación ocurre en otras leguminosas como la soya, en la que adquiere un incremento sustancial en el contenido de almidón en los cotiledones durante el desarrollo de la semilla y es seguida por un decremento, así que la semilla madura hidratada permanece con poco almidón. Esto se debe que el almidón es removido en estados tardíos del desarrollo para proveer esqueletos de carbono para la síntesis de proteínas y lípidos (Murray, 1988).

## 2.- Galactomanano.

El almidón no es el único carbohidrato que se almacena en dicotiledóneas, sino que existen otros azúcares poliméricos. En las leguminosas endospermicas el mayor producto de almacenamiento se deposita en paredes celulares del endospermo en forma de hemicelulosas. Estos productos son largos mananos que se puede depositar en grandes cantidades, al grado de involucrarse en el engrosamiento de las paredes celulares y son conocidos también como gomas.

Las reservas de mananos sirven a un gran número de plantas, y estos pueden tener una descripción general como polímeros ramificados de manosa; las ramificaciones se dan con cantidades pequeñas de azúcares como galactosa y glucosa. En el primer caso se denominan galactomananos y en el segundo glucomananos (Murray, 1988).

Los galactomananos se han encontrado en el endospermo de familias como la Caesalpiniceae, Mimosaceae y Fabacea (Meier y Reid, 1982), y también han sido reportados en especies de Annonaceae, Convolvulaceae, Ebanaceae, Loganiaceae y Palmae (Murray, 1988).

La estructura consiste de una cadena de manosa unida por enlace  $\beta$  (1-4), la cual contiene sustituciones de unidades D-galactopiranosil unidas por enlaces  $\alpha$  (1-6). La proporción de galactomanano de una semilla en particular depende de la extensión y del desarrollo del endospermo (Reid y Meier, 1972). El grado de sustitución de galactosa sobre la cadena de manosa varía de acuerdo a la leguminosa y se ha propuesto además que existe una remarcada correlación entre la posición taxonómica (a nivel de subfamilia) y las proporciones de manosa:galactosa, de esta forma se considera que durante el curso de la evolución se ha presentado un decremento en la cantidad del polisacárido paralelo a un incremento en la proporción de galactosa (Buckeridge *et al.*, 1995).

Contenidos bajos de galactosa (25-35% respecto a una relación 1:1) son típicos de leguminosas primitivas como Caesalpinioideae, mientras que altos grados de galactosa (cerca del 97% respecto a una relación 1:1) son características de leguminosas avanzadas como las Faboideas (Reid y Meier, 1970). Las propiedades físicas de los galactomananos están determinadas en parte por la cantidad y distribución de galactosa en las cadenas, como también por el peso molecular y la concentración del polímero (Ganter *et al.*, 1992). La importancia biológica de la proporción de manosa /galactosa en las semillas de leguminosa aún es desconocido, sin embargo ha sido relacionado con las interacciones que realiza con el agua. Durante la hidratación de las semillas de *Trigonella foenum-graecum*, el galactomanano contenido en el endospermo acumula una gran cantidad de agua, la cual sirve como reservorio durante la germinación del embrión y durante los subsecuentes periodos de desecación (Reid y Bewley, 1979).

En las leguminosas, el galactomanano se deposita en las paredes celulares del endospermo durante el desarrollo de la semilla y representa la fuente típica de reserva de nutrimento en éstas semillas ( Reid *et al.*, 1995). Reid y Meier (1970) estudiaron la biosíntesis de galactomanano en semillas de *Trigonella foenum-graecum* en diferentes estados de maduración. El polisacárido está presente a lo largo del desarrollo exceptuando las semillas muy jóvenes. También demostraron que existen cambios en los carbohidratos de bajo peso molecular durante el período de formación de galactomanano, de esta forma al iniciar la acumulación del polisacárido, las semillas contienen sacarosa, mioinositol, glucosa y galactinol, y al final el sacárido más abundante es estaquiosa (de la serie de rafinosa). Sioufis y colaboradores en 1970 (en Dey 1978) propusieron que la biosíntesis de galactomanano podría ser similar al mecanismo propuestos para la formación de estaquiosa, es decir, una transferencia de residuos de galactosa. Dey (1978) demostró la existencia de una ruta biosintética dependiente de nucleótidos glucosilados (UDP-D-Galactosa y GDP-D-Manosa). La formación de galactomanano puede ocurrir en vesículas de retículo endoplásmico rugoso y el polímero secretado a través del complejo de Golgi hacia el plasmalema y la pared celular (Meier y Reid, 1977). En 1985, Bewley propuso que en la vía de formación del polisacárido la manosa puede ser producida a partir de la sacarosa y entonces convertida a un nucleótido glucosilado:



en la reconstitución del tabaco, como agente ensamblador en la producción de explosivos (para el combate de incendios forestales), conjuntamente con el nitrato de amonio, en la industria minera y de perforación, y en el proceso de producción de petróleo (Daniel y Whistler, 1984). Recientemente se han estudiado las propiedades reológicas en solución acuosa de varios galactomananos obtenidos de semillas de leguminosas. Se ha medido su viscoelasticidad que está directamente relacionada con propiedades pseudoplásticas y cuya utilización es amplia en la industria de la transformación (Turquois *et al.*, 1992; Kapoor *et al.*, 1994).

### **E.- Fisiología del Desarrollo del Endospermo.**

Existe una clasificación que divide a las semillas en endospérmicas y no endospérmicas, dependiendo de la presencia o ausencia de éste tejido en la semilla madura. Se ha visto que: 1) el endospermo es formado y retenido como un órgano de reserva en la semilla madura hidratada y 2) el endospermo es formado, pero substancialmente es degradado durante el tiempo en que el embrión madura. El endospermo se propone como una fuente de reserva aunque esto no implica que todos los nutrimentos adquiridos por el embrión se obtengan vía endospermo. Durante el desarrollo del endospermo, algunos de los nutrimentos son obtenidos de los tejidos adyacentes y otros son sintetizados a partir del material transportado. De ésta forma el endospermo se convierte en una fuente de nutrimentos disponible para el embrión durante la maduración, el cual puede ser agotado parcial o totalmente al final del desarrollo de la semilla (Murray, 1984).

En semillas dicotiledóneas no endospérmicas las reservas del endospermo son consumidas durante el desarrollo del embrión y depositadas en los cotiledones, activando éstos como órganos de almacenamiento. En este caso, el endospermo residual está representado por algunos estratos de células muy vacuoladas que no contienen sustancias de reserva. En contraste, el endospermo se mantiene como un tejido permanente en semillas dicotiledóneas endospérmicas. El material de reserva en este caso se deposita en el lumen o en la pared de estas células y consisten generalmente de polímeros de manosa. Durante la germinación funciona principalmente como tejido de nutrición.

Desde fines del siglo pasado se han desarrollado investigaciones concernientes al tipo de carbohidrato de reserva que se presente en semillas endospérmicas, en particular con semillas de leguminosas. Se ha hecho relevante identificar el material de reserva del endospermo a partir de sus constituyentes, los procesos metabólicos y sus funciones a lo largo del desarrollo de la semilla. Los estudios realizados durante la década de los 60 y 70 han proporcionado valiosos datos acerca de la naturaleza, composición química y funcionalidad de las sustancias de reserva en el endospermo de leguminosas.

El mucílago encontrado en el endospermo de semillas de leguminosas es un polisacárido denominado galactomanano. En general los galactomananos no están asociados a la presencia de gránulos de almidón, pero se presentan en semillas que son ricas en oligosacáridos de la familia de la rafinosa. En tales semillas, se considera que funciona como una reserva de carbohidratos (Dey, 1978).

La síntesis de estos polisacáridos implica una transferencia de galactosa sobre la cadena lineal de manosa y se ha propuesto que la proporción resultante entre estos dos azúcares tiene implicaciones en la capacidad higroscópica del polisacárido. Edwards y col. (1992), utilizaron tres tipos distintos de semillas para observar el efecto de las proporciones manosa/galactosa, encontrando en el caso de *Sena occidentalis* una relación baja al inicio del desarrollo (2.3), para posteriormente incrementarse a 3.3. Otro caso se presenta en el estudio realizado por Mallet y colaboradores (1987) donde se observan cambios en la cantidad de galactosa durante la acumulación de galactomanano en semillas de *Gleditsia triacanthos*. En estos casos las actividades de la  $\alpha$ -galactosidasa coincide con la elevación de las proporciones manosa/galactosa, esto se explica debido a que se presenta una hidrólisis de los residuos de galactosa, la cual es controlada durante el mismo proceso biosintético.

Estudios realizados en la familia Convolvulaceae, particularmente en *Ipomoea muricata* (Khanna y Gupta, 1967) demostraron que el galactomanano presente en el endospermo de estas semillas tiene proporciones de manosa/galactosa 1.8.

Otro estudio realizado en Convolvulaceas, es el caso de *Turbina corymbosa*, en el cual se llegó a la conclusión de que el polisacárido de reserva que contiene el endospermo es galactomanano con una proporción molecular manosa/galactosa de 7.2 (Brechú-Franco, 1980; Brechú-Franco *et al.*, 1984).

### F.- Germinación de semillas en Angiospermas

La germinación en semillas ortodoxas se presenta sólo hasta que se ha pasado por un período considerable de crecimiento y desarrollo de acumulación de sustancias de reservas y finalmente por un etapa de desecación. Posteriormente a estos eventos las semillas atraviesan por una etapa de latencia, la cual puede durar meses o años. Una vez que se colocan en presencia de agua, comienza la imbibición y con ella una fase diferente. Esta fase tiene como resultado el crecimiento de la radícula y más tarde del tallo a expensas de los materiales de reserva (Murray, 1984). La germinación se ha definido como la reanudación del metabolismo, crecimiento y expresión del genoma, acompañado de la transformación del embrión en una plántula (Jann y Amen, 1977). Sin embargo, desde el punto de vista fisiológico, Bewley y Black (1985) delimitan el término y consideran que la germinación comienza con la entrada de agua a la semilla (imbibición) y termina cuando se inicia el crecimiento del eje embrionario, y se da la protrusión de la radícula, acompañado de numerosos eventos celulares.

Una semilla que no presenta los procesos de germinación, a pesar de que ésta se encuentre preparada para ellos, se dice que es quiescente y ocurre cuando las condiciones ambientales no son favorables. Por otro lado cuando la semilla no está preparada para germinar, aún cuando las condiciones sean las adecuadas, se encuentra en latencia. Las semillas que aún no son dispersadas de la planta madre tienen un bloqueo para germinar considerado como una latencia primaria. Posteriormente cuando las diásporas son dispersadas y este bloqueo continúa en la semilla madura deshidratada como resultado de las condiciones ambientales, se dice que posee una latencia secundaria.

El proceso que da origen a la germinación implica tres fases: imbibición, lag y alargamiento. La fase de imbibición implica la entrada de agua a la semilla. La cantidad de agua que entra a la semilla durante este período es generalmente pequeño, no excediendo tres veces el peso seco de la semilla y aumenta gradualmente en función del tiempo. En la fase dos o fase lag, la entrada de agua es constante, manteniendo un balance hídrico. Durante esta fase los eventos metabólicos de mayor relevancia tienen lugar en la preparación de la emergencia de la radícula, la cual se realiza al final de ésta fase. En la última fase (de alargamiento), sólo las semillas germinadas entran en ella, y está caracterizada por la elongación de la radícula. El primer signo de que la germinación se ha completado, es precisamente cuando se da el incremento en la longitud y el peso fresco de la radícula (Bewley y Black, 1985).

Durante la imbibición de la semilla se activan mínimamente tres vías metabólicas: glucólisis, vía de las pentosas fosfato y ciclo de los ácidos tricarbónicos. La glucólisis es catalizada por enzimas citosólicas las cuales pueden operar bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas, produciendo piruvato en la primera condición y ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub>. La cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa están relacionadas directamente con respiración de las semillas. Durante esta fase el transporte de electrones ocurre por una vía alternativa denominada de la oxidasa alternativa; posteriormente la generación de ATP se da por la vía clásica de la cadena respiratoria. Por otro lado la síntesis de proteínas es esencial en la germinación. Esta síntesis comienza después de la imbibición y es independiente en muchos casos de la síntesis *de novo* de RNA, sin embargo antes de completar la germinación se sintetiza nuevo RNA. La síntesis de DNA ocurre en muchas semillas solo después de la germinación y se considera una parte integral del crecimiento del eje. Debido a que el evento más importante en los tejidos de almacenamiento es la movilización de reservas, lo cual requiere de la participación de varias enzimas, es necesario en algunos casos sintetizarlas *de novo* (Murray, 1988).

### G.- Germinación en Convolvulaceas.

Se conoce que *I. purpurea* presenta una latencia primaria impuesta por la testa. Al eliminar la cubierta seminal se determinó que el embrión de la semilla recién deshidratada cuenta con la madurez fisiológica para llevar a cabo la germinación. Por lo que la germinación es afectada por la testa impermeable al agua y gases (Ponce-Salazar *et al.*, 1990, 1993; Brechu-Franco, 1994). Una vez que se ha eliminado la testa, las semillas logran desencadenar la germinación. En el caso de *I. purpurea* es necesario la escarificación ácida (Crowley y Buchanan, 1980). De esta manera la latencia a este nivel constituye una estrategia de supervivencia que mantiene a las semillas viables por tiempos variables, hasta que se presentan las condiciones favorables para germinar y lograr el establecimiento de la plántula (Brechu-Franco, 1994)

Otro caso es *Turbina corymbosa* donde se ha demostrado la presencia de testa impermeable al agua. La germinación en esta semilla indica que el polisacárido de reserva no es utilizado durante las primeras etapas de la germinación; la movilización de las sustancias nutritivas en este periodo se originan del embrión. La degradación de reservas

del endospermo ocurre entre los 60 y 120 horas de iniciada la imbibición, alcanzando entonces la hidrólisis completa (Brechu-Franco, 1980)

### **H- Movilización de carbohidratos durante la Germinación y Postgerminación**

Durante la germinación, la sacarosa y los oligosacáridos de la serie de la rafinosa son hidrolizados y sus niveles declinan. Aún cuando existe muy poca evidencia de que los monosacáridos liberados son utilizados como substratos para la germinación es probable que esto suceda. La fructosa y glucosa libre pueden acumularse en las semillas durante la hidrólisis de la sacarosa y de los oligosacáridos, sin embargo no se ha encontrado galactosa, por lo que se propone que ésta sea rápidamente utilizada en la formación de paredes celulares (McCleary y Matheson, 1974).

La movilización de sustancias de reserva en tejidos de almacenamiento invariablemente comienza después de la protrusión de la radícula, considerado entonces como un evento postgerminativo. En regiones de crecimiento algunas movilizaciones pueden ocurrir antes de que la germinación sea completada, es este caso las reservas están generalmente presentes en cantidades menores, de esta forma los productos de la hidrólisis puede ser importante para los procesos de establecimiento de la plántula. La forma de movilizar las reservas de alto peso molecular es su conversión a formas transportables hacia los sitios de requerimiento (tejidos en crecimiento) donde serán utilizados en la producción de energía y síntesis de otras sustancias (Bewley y Black, 1985).

Los órganos de almacenamiento contienen cantidades apreciables de dos o más carbohidratos de reserva: almidón y hemicelulosas (galactomanano). El grano de almidón puede ser degradado durante la germinación mediante dos vías: la hidrolítica y/o la fosforolítica. La vía hidrolítica es aquella que puede romper los enlaces glucosídicos tanto de la amilosa como de la amilopectina, por la introducción neta de una molécula de agua. Durante la germinación, este proceso se inicia por la acción de la  $\alpha$ -amilasa sobre el grano de almidón, la cual es capaz de romper las uniones entre glucosas con enlaces  $\alpha(1-4)$  pero no los que presentan enlace  $\alpha(1-6)$ , dando como productos finales : glucosa, maltosa y oligosacárido ramificado. Esta última es conocida como dextrina límite, la cual es desdoblada por una enzima desramificante. Asimismo, existe otra enzima que actúa sobre los mismos enlaces pero desde el extremo no reductor del polisacárido y se conoce como  $\beta$ -amilasa. Los productos de estas dos enzimas son desdoblados a glucosa por medio de una  $\alpha$ -glucosidasa. La vía alterna de la degradación del almidón emplea fósforo para la ruptura del enlace entre las dos glucosas. La enzima que realiza esta ruptura es la fosforilasa del almidón, rindiendo como productos finales al almidón menos un residuo de glucosa, más la glucosa 1-fosfato. Con la glucosa liberada, la síntesis de sacarosa se presenta como una forma de movilizar esta fuente de carbono (Preiss y Levi, 1982).

En dicotiledóneas no endospermicas, las primeras etapas de la germinación están caracterizadas por la utilización de sustancias de reserva como las proteínas, lípidos y carbohidratos, éstos están almacenados en la radícula. Así, la rafinosa , la estaquiosa y la sacarosa son la fuente inicial de carbohidratos. En chícharo se encuentra una pequeña cantidad de las amilasas, la hidrólisis e n los cotiledones se inicia después de la emergencia

y elongación de la radícula. El consumo de almidón en este caso es bifásico; la inicial o lenta se debe a la actividad de la fosforilasa del almidón, la segunda fase o rápida se debe a la actividad hidrolítica (Díaz- Pontones *et al.*, 1992).

En semillas maduras de dicotiledóneas que poseen un endospermo, las paredes del endospermo están constituidas del 10 al 50 % por galactomanano. Trabajos realizados en alholva durante la germinación, demuestran que en las primeras fases el embrión utiliza los oligosacáridos como la rafinosa para la obtención de glucosa y galactosa (Reid 1971). En un proceso posterior, la utilización del galactomanano se inicia por la liberación de las enzimas:  $\alpha$ -galactosidasa (EC3.2.1.22) que remueve la D-galactosa con enlace  $\alpha$  (1-6);  $\beta$ -mananasa (EC.3.2.1.78), que hidroliza los enlaces  $\beta$ (1-4)D-mananos y  $\beta$ -manosidasa (EC.3.2.1.25) que hidroliza los productos de la  $\beta$ -mananasa para completar el rompimiento a D-manosa. La  $\beta$ -manosidasa también es conocida como  $\beta$ -manosidasa monohidrolasa o exo- $\beta$ -mananasa (McCleary y Matheson, 1975; Spyropoulos y Reid, 1988).

La  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$  -mananasa son producidas por la capa de aleurona del endospermo, probablemente por síntesis *de novo* , mientras que la  $\beta$  -manosidasa esta presente en un estado activo en el endospermo (Reid y Meier, 1972; Seiler, 1977; MacCleary y Matheson, 1983). Eventualmente el endospermo es hidrolizado y los productos de éstos son absorbidos por los cotiledones por difusión pasiva (Uebelman, 1978), o bien la manosa y la galactosa pueden ser transportados por acarreadores específicos además del componente de difusión pasiva (Zambou y Spyropoulos, 1989 y 1990). En este último caso son fosforilados (a galactosa 1-fosfato y manosa 6-fosfato) y por una serie de pasos pueden ser utilizados para la síntesis de sacarosa, la cual puede ser enviada al eje embrionario. Si los niveles de sacarosa son altos, estos pueden ser utilizados para la síntesis temporal de almidón (Reid, 1971). Las leguminosas endospérmicas son únicas en el sentido de que los cotiledones no contienen almidón, sino hasta que éste es sintetizado como reserva temporal después de la germinación (Bewley *et al.*, 1993).

La regulación de la movilización de galactomanano se ha estudiado en los últimos años. El embrión a nivel del eje embrionario regula durante la primera parte de la germinación la inhibición del rompimiento del polisacárido y la producción de  $\alpha$ -galactosidasa. A nivel del endospermo no se conoce totalmente la naturaleza del inhibidor, pero se postula la presencia de ácido abscísico (Reid *et al.*, 1977; Spyropoulos y Reid, 1985, Malek y Bewley, 1991) y sustancias saponificables (Zambou *et al.*, 1993).

### **I.- Fisiología de la Postgerminación: el papel del Endospermo.**

Los fenómenos de movilización de galactomanano se presentan durante la postgerminación, en la cual funciona como fuente de carbono para muchas de las semillas dicotiledóneas endospérmicas. Los productos de la hidrólisis del polisacárido son la D-galactosa y D-manosa que no son almacenados en el endospermo sino que son absorbidos rápidamente por el embrión y pueden ser convertidos en sacarosa y/o almidón transitorio, lo cual permite el establecimiento y crecimiento de la plántula.

En el caso de *Turbina corymbosa*, en la que se ha analizado al galactomanano y los cambios que sufre el endospermo durante la postgerminación y se propone que el endospermo funciona de tres maneras: como un tejido de absorción de agua, como un material que ejerce presión hacia la testa provocando su rompimiento y como un material de reserva utilizado en el desarrollo vegetativo de la planta (Brechu-Franco, 1980; Brechu-Franco *et al.*, 1984).

Existe semejanza entre los estudios realizados en leguminosas y la familia Convolvulacea (Brechú-Franco *et al.*, 1990) ya que presentan un endospermo con un polisacárido que al contacto con el agua se convierte en un mucílago (galactomanano). Dentro de las Convolvulaceas de interés especial se encuentra *Ipomoea purpurea*, arvense que causa serios daños a la agricultura, cuyos estudios se han enfocado al desarrollo de las semillas, con el fin de controlarla. No existen trabajos realizados en esta semilla a nivel de composición de endospermo y caracterización de sustancias de reserva (polisacáridos de galactosa y carbohidratos solubles), por lo que es necesario abundar en el conocimiento a nivel bioquímico de los fenómenos de depositación, transformación y utilización de estos carbohidratos durante el desarrollo, germinación y postgerminación en *I. purpurea*.

El grupo de las malezas o malas hierbas, dentro de las cuales se encuentran las arvenses, se definen como aquellas que afectan considerablemente el desarrollo del cultivo que invaden, y constituyen uno de los problemas de mayor importancia en la agricultura ya que establecen una competencia por luz, nutrimentos, agua, espacio, y otros requerimientos para el desarrollo. Los daños producidos se interpretan como bajas en los rendimientos y en la calidad de los cultivos. Las arvenses afectan cultivares de importancia económica como el maíz, frijol, arroz, trigo, cebada, avena, sorgo y muchos más.

La capacidad de las arvenses para sobrevivir a medios hostiles y competir exitosamente con otras plantas se debe a su alto grado de especialización, es decir, adaptaciones muy características. Entre las adaptaciones encontramos la de tener una alta producción de semillas con alta viabilidad, germinación rápida, pronto establecimiento y crecimiento de la plántula. Además, esta última característica se deben al tamaño de la raíz, los cotiledones y al índice de hojas producidas. El desarrollo de las estructuras, se encuentran influenciadas directamente por los eventos embriológicos, fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante la fase de desarrollo de la semilla.

Dentro del grupo de las malas hierbas se encuentra el género *Ipomoea*, dicotiledónea que pertenecen a la familia Convolvulaceae de hábito rastrero o trepador. Una de ellas es *Ipomoea purpurea*, la cual causa serios daños a cultivos básicos como el maíz y el frijol (entre 40 cultivos). Esta arvense ha sido poco estudiada a nivel bioquímico, por lo que se requiere de un conocimiento más amplio acerca de su ciclo de vida, fisiología y los mecanismos adaptativos que le permiten desplazar a los cultivos. Por otra parte, las malas hierba elevan los costos de operación de las siembras y cosecha así como decremento en rendimientos y productividad. Además la presencia de semillas arvenses como contaminantes de semillas de importancia económica, hace que disminuya su valor comercial hasta el grado de impedir su exportación.

Dada su amplia distribución en zonas templadas de México y su importancia agrícola, es trascendente abundar en el conocimiento de los mecanismos adaptativos a nivel bioquímico que utiliza *I. purpurea* y que favorecen su competitividad. Es claro que la formación, almacenamiento y posterior utilización de los materiales de reserva en la semilla juegan un papel preponderante entre sus adaptaciones como maleza. En este sentido, es de especial importancia conocer el tipo de polisacárido que almacena como fuente principal de carbono durante el desarrollo y su posterior utilización en los procesos de germinación asociándolo a las enzimas involucradas. De esta manera se conocerá más acerca del metabolismo central de la semilla. La generación de nuevo conocimiento ayudará a encontrar diferencias en comparación con los cultivos que invade, para lograr en un futuro un método específico de control, con el fin de minimizar los problemas económicos producidos por la maleza y de manera indirecta la posible utilización de la semilla en la industria.

**A- OBJETIVO GENERAL.**

Estudiar la acumulación, degradación y transformación de Galactomanano durante el desarrollo, germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea* (L) Roth.

**B- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

a- Determinar durante el desarrollo de la semilla *I. purpurea* (desde la antesis hasta la semilla madura deshidratada).

- 1.- La cantidad de galactomanano.
- 2.- Las pozas acumulables de carbohidratos solubles: sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa y oligo de galactosa con enlace alfa.
- 3.- La actividad de las enzimas  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa, involucradas en la degradación de galactomanano.

b- Determinar durante la germinación y postgerminación de la semilla *I. purpurea* (de las 0 a las 72 hrs de imbibición).

- 1.- La cantidad de los polisacáridos, galactomanano y almidón.
- 2.- Las pozas acumulables de carbohidratos solubles.
- 3.- La actividad de las enzimas  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa, involucradas en la degradación de galactomanano.
- 4.- La actividad amilolítica involucrada en la degradación de almidón.

VI.- MÉTODOS

- A.- Material biológico
- B.- Desarrollo de semillas
- C.- Germinación de semillas
- D.- Extracción de carbohidratos solubles
- E.- Cuantificación de carbohidratos solubles totales
- F.- Determinación de carbohidratos solubles por pruebas químicas
- G.- Cuantificación de Gal y nRaf por pruebas enzimáticas
- H.- Determinación del tipo de  $\alpha$ -Galactosil Oligosacárido
- I.- Cuantificación de Sac, Glu y Fru por pruebas enzimáticas
- J.- Extracción y cuantificación de GLM
- K.- Pureza del GLM
- L.- Extracción y cuantificación de Alm
- M.- Extracción y cuantificación de actividades enzimáticas
  - 1.-  $\alpha$ -Galactosidasa y  $\beta$ -Manosidasa
  - 2.-  $\beta$ -Mananasa
- N.- Extracción y cuantificación de la actividad amilolítica

### A.- Material Biológico.

Se colectaron semillas maduras deshidratadas de campos de cultivo de maíz del estado de Morelos, los cuales se encontraban infestados con *Ipomoea purpurea*. Estas fueron usadas como banco de semillas para propagar la planta. Las plantas fueron crecidas en el invernadero de la UAM-I en la ciudad de México y de éstas se obtuvieron las semillas en desarrollo y las semillas maduras deshidratadas. Con respecto a las semillas en desarrollo, se colectaron los frutos cada 30 días, durante los tres meses subsecuentes a la primera floración. Este material biológico se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las semillas maduras deshidratadas se conservaron a temperatura ambiente.

### B.- Desarrollo de Semillas.

Para la cuantificación de carbohidratos, el desarrollo de la semilla se consideró desde la antesis hasta la semilla madura deshidratada. El desarrollo se dividió en 10 etapas de acuerdo al peso fresco de la semilla, cuyo intervalo está comprendido de entre 1 y 50 mg (Díaz-Pontones, 1992). Las determinaciones de carbohidratos y actividades enzimáticas se realizaron en la semilla completa y por estructura: testa, endospermo y embrión. En este caso la disección se realizó bajo microscopio estereoscópico y sobre un soporte a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### C- Germinación de Semillas.

Siete lotes de 100 semillas se escarificaron por la región del micrópilo, se esterilizaron superficialmente en una solución al 3% de hipoclorito de sodio durante 15 min y posteriormente se lavaron tres veces con agua estéril. En condiciones de esterilidad, las semillas se colocaron en cajas de Petri y se les adicionó 5ml de agua destilada. Las semillas se germinaron en obscuridad a  $25^{\circ}\text{C}$  durante el período de imbibición determinado (Brechú-Franco, 1994). Al final de cada período de imbibición (de 0 a 72 hrs con intervalos de 12 hrs cada uno) se tomaron los siguientes parámetros fisiológicos: peso fresco, longitud de radícula y peso seco. La determinación de las pozas de carbohidratos y actividades enzimáticas se realizaron en el germinado completo y por estructura: testa-endospermo (considerado como endospermo) y embrión. En este último caso se realizó la disección del germinado bajo microscopio estereoscópico y sobre un soporte a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### D- Extracción de Carbohidratos Solubles.

De cada etapa de desarrollo se tomaron 200 mg de semillas y se homogeneizaron a  $4^{\circ}\text{C}$  adicionando 2 ml de etanol al 80%. Las muestras homogeneizadas se colocaron en un baño a  $84^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Después de ser solubilizadas las muestras se centrifugaron a 1100 g durante 10 min, el sobrenadante se separó y se almacenó. El botón se lavó tres veces con 3 ml de etanol al 80% (Adams *et al.*, 1980; Saravitz *et al.*, 1987; Lambrechts *et al.*, 1994). El extracto etanólico se fraccionó en alícuotas de 0.5 ml, las cuales se colocaron en un desecador con sílica gel durante 48 hrs para su total desecación (Fig. 1a ).

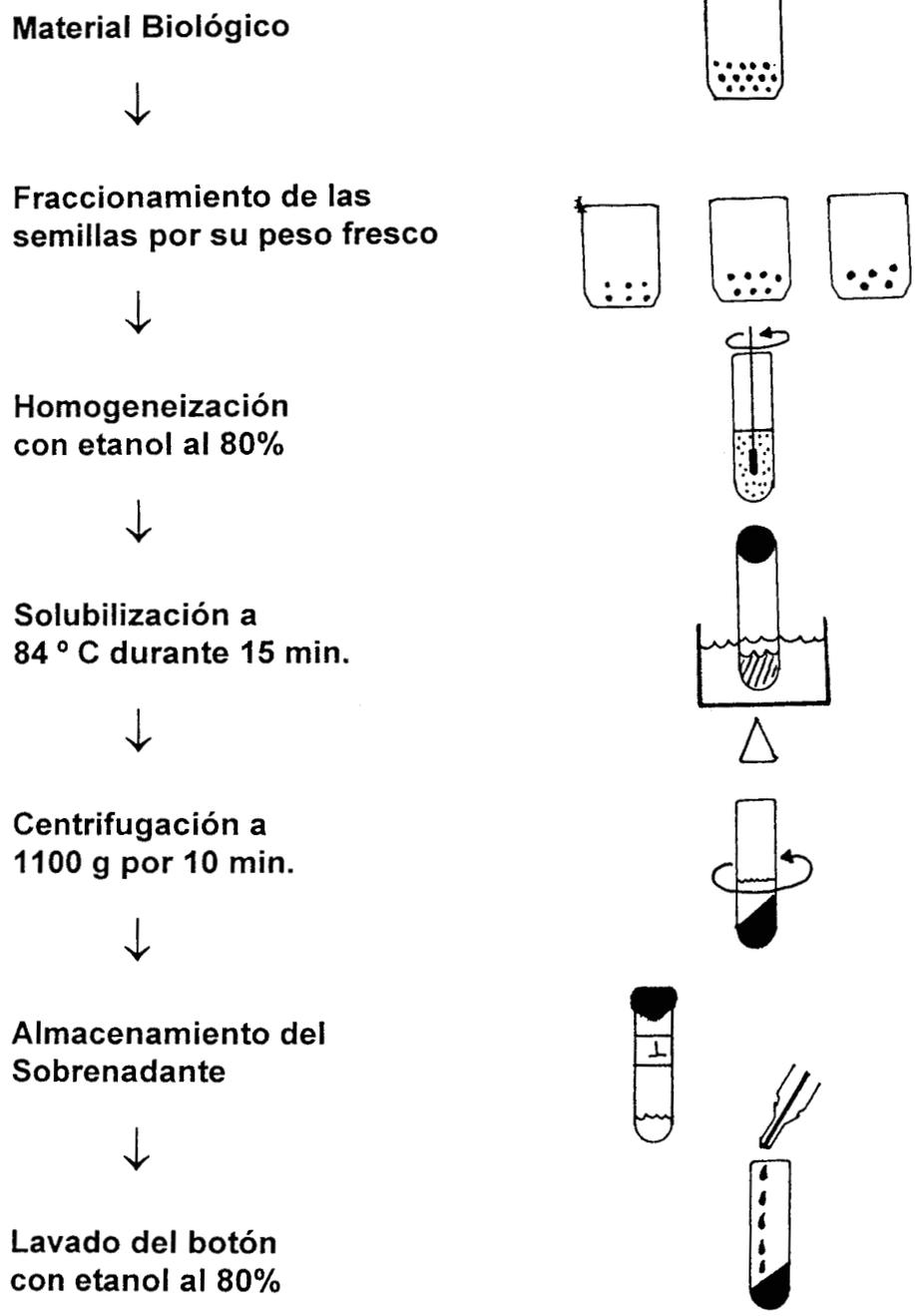


Fig. 1a Diagrama del método de extracción de carbohidratos solubles

### **E- Cuantificación de Carbohidratos Reductores Totales.**

La cuantificación de los carbohidratos obtenidos en la sección anterior se realizó por el método de Antrona. Se utilizó un curva estándar de glucosa y las muestras se midieron a 620 nm (Fig. 1b). Esto permitió conocer la cantidad de reductores totales presentes en extractos solubilizados de la semilla (Yemn y Williams, 1954; González y Penaloza, 1984).

### **F- Determinación de Carbohidratos Solubles por Pruebas Químicas**

Se utilizaron además, pruebas químicas específicas para la determinación de los carbohidratos presentes en los extractos del desarrollo. Las pruebas utilizadas fueron: Fehling, para determinar azúcares reductores; bial-orcinol, para detectar la presencia de pentosas; difenilamina y Borenfreund, para detectar cetohexosas; carbazol y cisteina- $H_2SO_4$ , para determinar la presencia de hexosas (Kabat y Mayer, 1968; Ortega, 1986).

### **G- Cuantificación de Galactosa y $\alpha$ -Galactosil Oligosacárido por Pruebas Enzimáticas**

La muestra desecada se resuspendió en 0.2 ml de agua. De las muestras se determinó la cantidad de galactosa libre o galactosa proveniente del oligosacárido mediante la hidrólisis previa utilizando la enzima  $\alpha$ -galactosidasa. La galactosa se estimó mediante métodos enzimáticos utilizando estuches comerciales (Boehringer Mannheim GmbH). La galactosa se acopló a una reacción en presencia de galactosa deshidrogenasa, produciendo galactono-lactona y la reducción del NAD (Fig. 1c). Este último se midió a 365 nm (Bergmeyer *et al.*, 1974; Beuther, 1984; Kurz y Wallenfels, 1974; Walter, 1980).

### **H- Determinación del tipo de $\alpha$ -Galactosil Oligosacárido.**

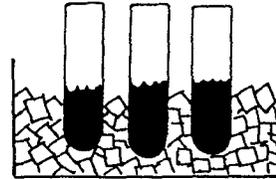
Para determinar el tipo de  $\alpha$ -galactosil oligosacárido presente, inicialmente la muestra desecada se resuspendió en etanol al 80% y se sometió a cromatografía en placa fina bidimensional (HPTLC- A.K. 60 F<sub>254</sub>, Merk 5548). Se utilizaron como sistemas de solventes: fenol-ácido acético-EDTA-agua (840:10:1:160) y butanol-acetato de etilo-ácido acético-agua (40:30:25:40). Se determinó el R<sub>f</sub> y se comparó contra los estándares. Posteriormente se determinó la proporción galactosa: sacarosa presente en la molécula. Para esto se cuantificó la cantidad de galactosa proveniente del oligosacárido después de la hidrólisis con  $\alpha$ -galactosidasa (ver sección F) y la cantidad de sacarosa proveniente del mismo después de la hidrólisis (ver sección H). Las proporciones resultantes entre galactosa y sacarosa permitieron determinar que tipo de oligosacárido se encontraba.

### **I- Cuantificación de Sacarosa, Glucosa y Fructosa por Pruebas Enzimáticas.**

La muestra desecada se resuspendió en 0.2 ml de agua. Se determinó la cantidad de sacarosa, glucosa y fructosa, utilizando pruebas enzimáticas específicas (Estuche enzimático Boehringer Mannheim GmbH). Se cuantificaron los equivalentes de glucosa-6-

fosfato productos de la glucosa libre, de la hidrólisis de sacarosa y de la transformación de fructosa. La glucosa -6-fosfato se acopló a una reacción en presencia de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa para producir gluconato-6-fosfato y NADH +H<sup>+</sup> (Fig. 1d). La concentración del último producto se determinó a 365 nm (Bergmeyer *et al.*, 1974; Beuther, 1984; Kurz y Wallenfels, 1974; Walter, 1980).

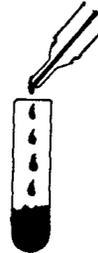
**Preparar las muestras de cada lote y la curva estándar en hielo durante 45 min.**



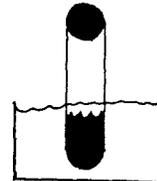
**Colocar la solución de Antrona (0.2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en hielo.**



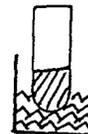
**Adicionar la solución de antrona (1 ml) a las muestras.**



**Colocar las muestras a 92 ° C durante 8 min.**



**Detener la reacción colocando las muestras en hielo.**



**Leer la absorbencia de las muestras a 620 nm**

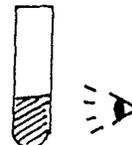


Fig. 1b Diagrama del método de cuantificación de carbohidratos reductores totales con el reactivo de antrona.

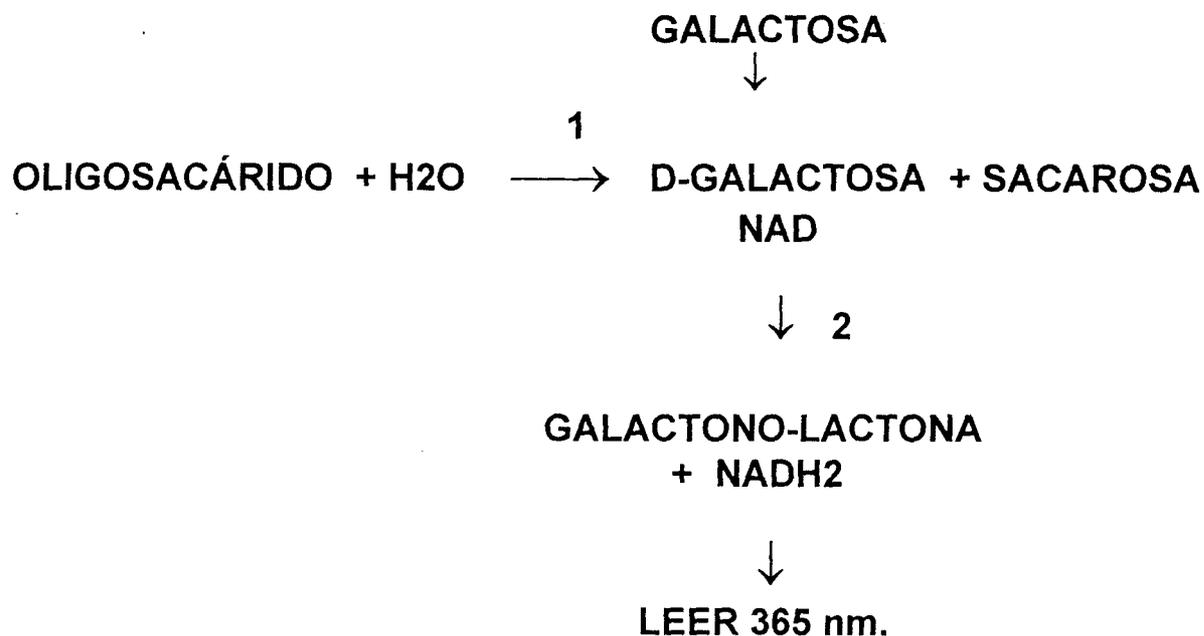


Fig. 1c Diagrama del método para cuantificar galactosa y  $\alpha$ -galactosil oligosacárido por pruebas enzimáticas. 1-  $\alpha$ -galactosidasa. 2- Galactosa deshidrogenasa.

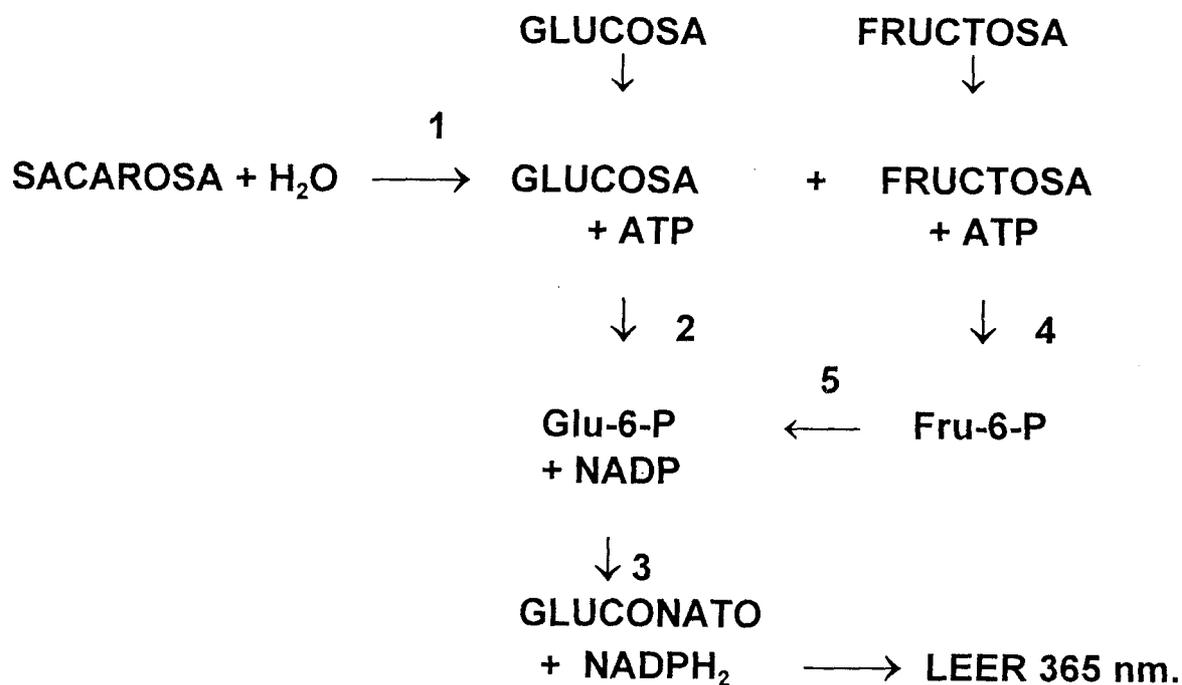


Fig. 1d Diagrama del método para cuantificar sacarosa, glucosa y fructosa por pruebas enzimáticas. 1-  $\beta$ -fructosidasa, 2 y 4- Hexocinasa, 3- Glu-6-P deshidrogenasa y 4- Fosfoglucosa isomerasa.

### J- Extracción y Cuantificación de Galactomanano.

Después de extraer los azúcares solubles, el precipitado de cada lote se hidrató (1:27 w/v) durante 48 hrs a 5°C. Posteriormente, la muestra se incubó en un baño a 84°C durante 35 min. La suspensión se centrifugó a 1500 g durante 10 min. Al botón se le realizó una nueva extracción. Los sobrenadantes se combinaron y se les agregó etanol al 40% y el sobrenadante resultante se llevó a una concentración final del 80%. Se conjuntaron los botones y la muestra conteniendo al galactomanano. Se mantuvo toda una noche a 5°C en 5 volúmenes de etanol, al final se colectó el precipitado por centrifugación a 1500 g durante 10 min. El botón se desecó, y se disolvió en agua en el momento de su uso (Fig. 1e). Esto se consideró como galactomanano o extracto crudo del polisacárido (Larson, 1955; Edwards *et al*, 1989; Buckeridge y Dietrich, 1990; Buckeridge *et al*, 1995). La cantidad de galactomanano se determinó por el peso del extracto, denominado como el método gravimétrico y se determinaron los equivalentes de galactosa (Equiv de Gal) obtenidos previo a la hidrólisis del compuesto mediante  $\alpha$ -galactosidasa, acoplado a un estuche enzimático para determinar galactosa (Ver Sección F).

### K- Pureza del Galactomanano.

El galactomanano obtenido se sometió a una hidrólisis ácida con  $H_2SO_4$  al 1N durante 12 hrs (Andrews *et al*, 1952; Mallett *et al*, 1987). Posteriormente se neutralizó con  $Ba(OH)_2$  1N y se centrifugó a 9000g durante 10 min (Harborne, 1991). La muestra se separó por medio de una cromatografía en placa fina (HPTLC- A.K. 60 F<sub>254</sub>, Merk 5548). La fase móvil utilizada fue n-propanol-etanol-agua (7:1:2). Las placas fueron reveladas mediante aspersion con una solución al 5% de  $H_2SO_4$  en ETOH y calentadas a 110°C durante 5-10 min. (McCleary, 1983; Spyropoulos y Reid, 1988; Edwards *et al*, 1989 ).

### L- Extracción y Cuantificación de Almidón.

La determinación de almidón se realizó durante la germinación. El tejido de cada etapa de imbibición se homogeneizó en un volumen mínimo de una solución de azida de sodio al 0.02%. Se agregó 160  $\mu$ l de una solución de  $I_2$ -KI y se filtró el homogenado a través de una muselina. Posteriormente se agitó el filtrado por espacio de una hora en un baño de agua-hielo. Al término se centrifugó a 2,500 g durante 15 min y el botón se resuspendió en 2 ml de azida de sodio fría, para filtrarla por una malla de 100  $\mu$ m. El filtrado se sometió a centrifugación nuevamente. El botón se resuspendió en etanol al 70 % durante 15 min. y después en etanol al 100 % por 20 min. Pasado este tiempo se decantó y se sustituyó por hexano, manteniéndose en él durante 48 hrs. El hexano se sustituyó por etanol al 100% y éste a su vez por etanol al 80%. El almidón se desecó a temperatura ambiente durante 24 hrs (Díaz-Pontones, 1991).

El método que se utilizó para la cuantificación de almidón fue el iodométrico. El almidón se gelificó con KOH 0.5 N durante 72 hrs a temperatura ambiente. Posteriormente se sometió a ebullición por 30 min. y se recuperó el volumen perdido. El almidón disuelto

fue acidificado con HCl 1N. Se tomó una alícuota de volumen conocido y se llevó a 1 ml de amortiguador de acetatos 0.2 M pH 4.7 (Fig. 1f) Para la formación del complejo yodo-almidón, a la muestra se le agregó 20  $\mu$ l de I<sub>2</sub>-KI acidulada (I<sub>2</sub>: 12.7 g, KI: 30 g, HCl 1N: 2.2 ml, H<sub>2</sub>O: 1,000 ml) se agitó y se determinó su absorbencia a 620 nm. Se realizó una curva patrón empleando almidón soluble Merck (Díaz-Pontones, 1991).

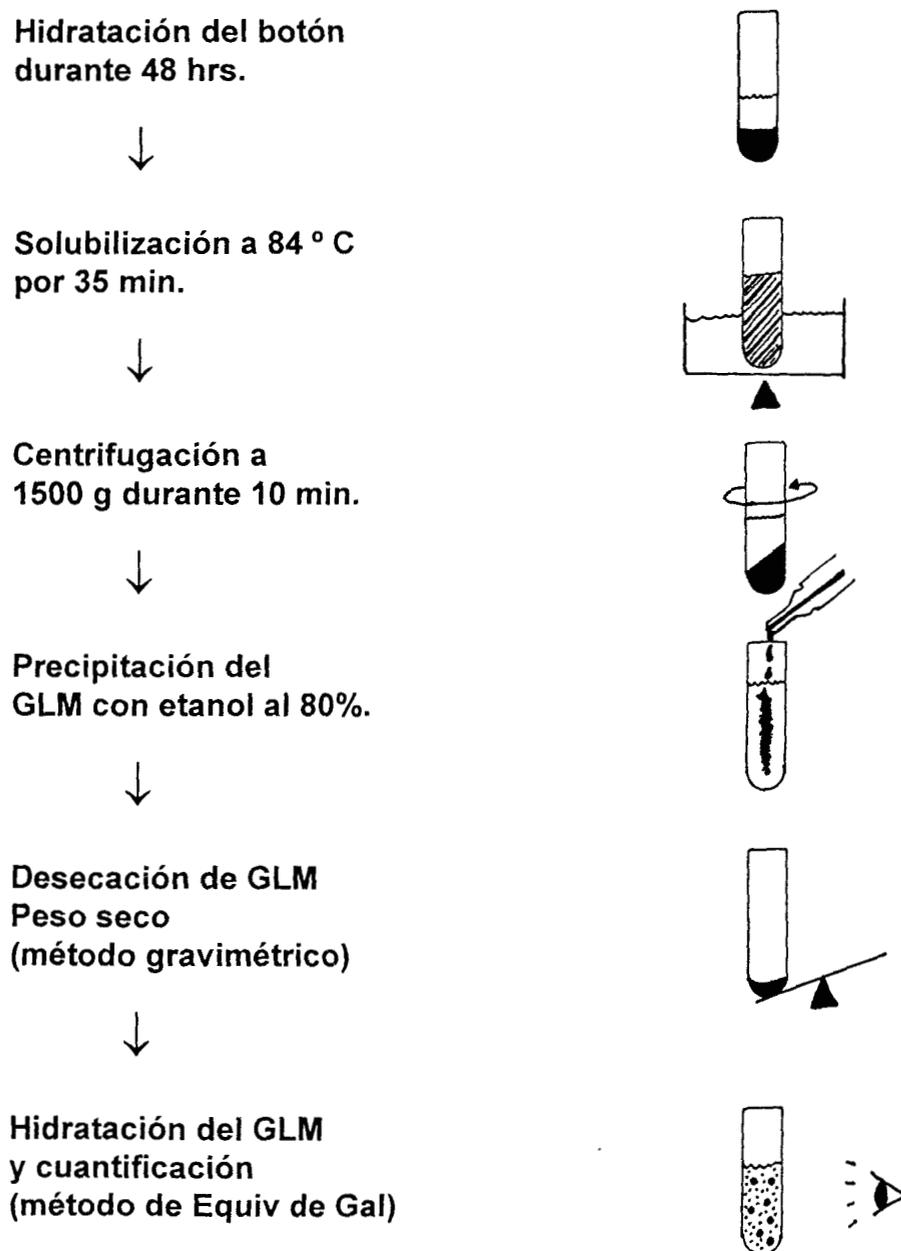


Fig. 1e Diagrama del método de extracción y cuantificación de galactomanano.

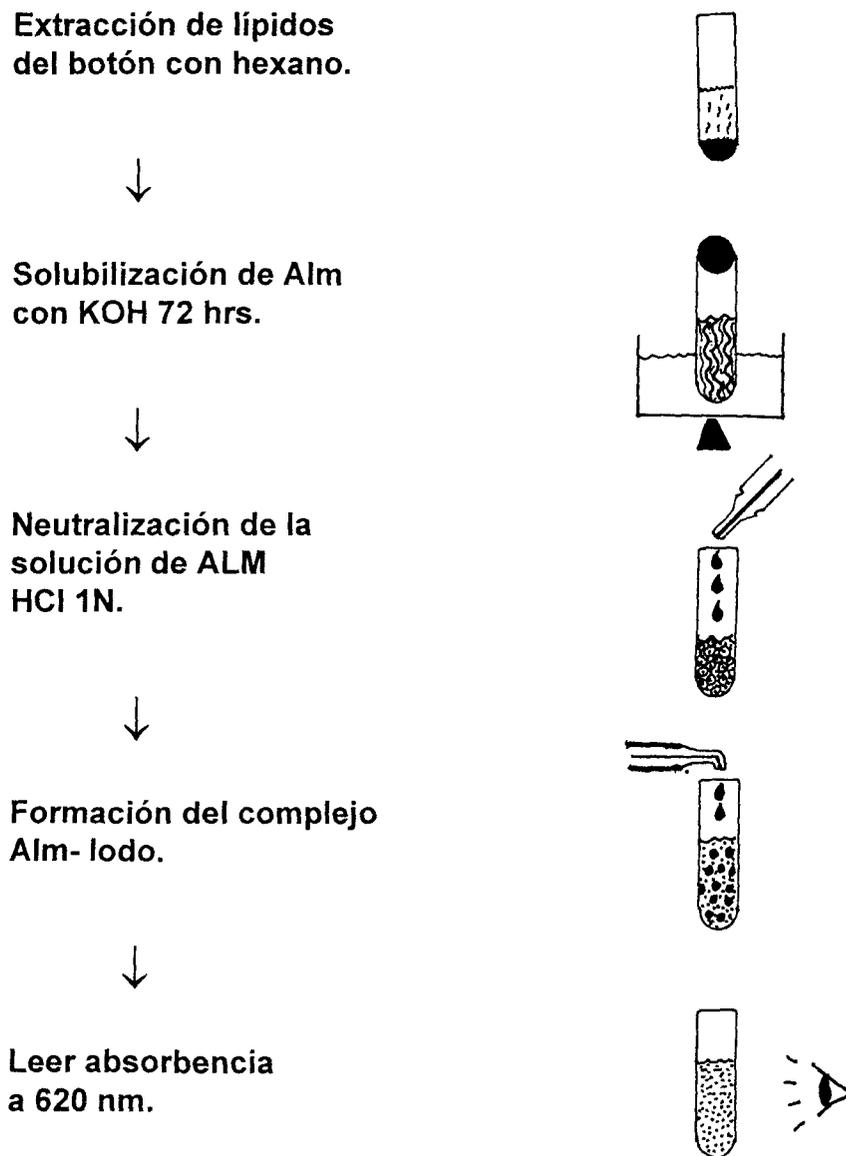


Fig. 1f Diagrama del método de extracción y cuantificación de almidón.

## M- Extracción y Cuantificación de la Actividad de Enzimas hidrolíticas.

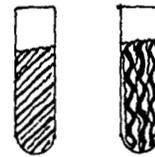
### 1.- $\alpha$ -Galactosidasa y $\beta$ -Manosidasa.

La extracción de  $\alpha$ -Galactosidasa y  $\beta$ -Manosidasa se realizó mediante dos procedimientos. En ambos casos la extracción se realizó a 0 °C. Bajo el primer procedimiento grupos de 5 semillas de acuerdo a las etapas previamente señaladas fueron homogeneizados en 3 ml de amortiguador McIlvaine (citratos 0.1M y fosfatos 0.2M) pH 5.1 con BSA 1 mg/ml. El homogenado posteriormente fue centrifugado a 1000 g durante 10 min y el sobrenadante se utilizó para realizar las mediciones enzimáticas (modificado de Spyropoulos y Reid, 1985 y Ouellette y Bewley, 1986). El segundo procedimiento de extracción consistió en homogeneizar grupos de 5 semillas en un amortiguador de alta salinidad consistente de Tris-HCl 0.05 M pH 8.0, BSA 1 mg/ml y NaCl 0.2 M. Posteriormente se centrifugó a 14,000 g durante 10 min. Al finalizar, el sobrenadante se utilizó para medir la actividad enzimática de ambas enzimas (McCleary, 1983 y Ouellette y Bewley, 1986). Para realizar las determinaciones por estructura, se realizó una disección manual a 4°C. El embrión fue suspendido en el amortiguador de extracción y se agitó gentilmente para remover el GLM adherido a los cotiledones. Esta solución fue adicionada para la homogeneización del endospermo. El embrión fue lavado en dos ocasiones y entonces homogeneizado en un volumen conocido. Para determinar la actividad en la semilla madura deshidratada, estas se imbibieron en agua y se colocaron a 4 °C durante 12 hrs.

La actividad de la  $\alpha$ -Galactosidasa se determinó en el sobrenadante por duplicado bajo la siguiente mezcla de reacción: 37  $\mu$ l del extracto crudo, 37  $\mu$ l del sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-Galactopiranosido (PNPG, 0.01 M) en amortiguador de citratos-fosfato a pH 5.1 y BSA 1 mg/ml. Se determinó el lapso de tiempo de incubación adecuado para la determinación de la actividad enzimática, en donde se conserva la linealidad entre el tiempo y el cambio de absorbencia. Así se estimó que el tiempo idóneo de incubación a 30°C fue de 30 min para el desarrollo y de 15 min para la fase de germinación utilizando una dilución de 1:10 del extracto. Al final de el periodo de incubación la reacción fue detenida agregando 930  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.1 M) en frío (Fig. 2a). La absorbencia del grupo nitrofenil liberado se determinó a 400 nm (modificado de Spyropoulos y Reid, 1985).

La  $\beta$ -Manosidasa se midió utilizando como sustrato el p-nitrofenil- $\beta$ -D-manopiranosido (PNPM) como sustrato. La mezcla consistió de 37  $\mu$ l del extracto crudo, 37  $\mu$ l del sustrato PNPM ( $2.5 \times 10^{-2}$  M) en amortiguador de citratos-fosfato pH 5.1 y BSA 1 mg/ml. La reacción se inició por adición del extracto enzimático y se colocó a 30 °C durante 30 min., en el caso de semillas en desarrollo, y por 20 min. en el caso de semillas en germinación. La reacción fue detenida por adición de 930  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M en frío (Fig. 2b). Se midió la cantidad de nitrofenil liberado mediante su absorbencia a 400 nm (modificado de Ouellette y Bewley, 1986 y Spyropoulos y Reid, 1988).

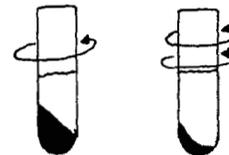
Homogeneización y solubilización de las enzimas



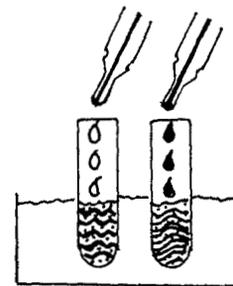
En amortiguador de  
a) Citratos 0.1M y Fosfatos 0.2M pH 7.5  
b) Tris-HCl 0.05 M pH 8.0 y NaCl 0.2 M.



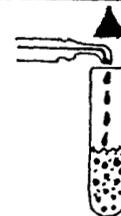
Centrifugación a  
a) 1000 g durante 10 min.  
b) 14,000 g durante 10 min.



Incubación con los sustratos:  
PNP- $\alpha$ -D-Galactopiranosido y  
PNP- $\beta$ -D-Manopiranosido.



Adición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
para detener la reacción.



Leer la absorbencia a  
400 nm.

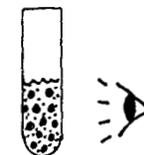


Fig. 2a Diagrama del método de extracción y cuantificación de la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -manosidasa.

222872

**b.-  $\beta$ -Mananasa.**

La extracción de la enzima se realizó utilizando un amortiguado citratos-fosfato pH 5.1 con BSA 1 mg/ml (Spyropoulos y Reid, 1985). La actividad de la endo- $\beta$ -Mananasa se cuantificó por ensayo de difusión en gel. El gel se colocó en cajas de Petri conteniendo 0.1% de GLM y 0.7% de phytigel (Sigma). Sobre el gel se realizaron pozos de 2 mm de diámetro y se colocan 10  $\mu$ l de extracto enzimático. Las cajas se sellaron con parafilm y se incubaron a 40 °C durante 16 hrs en oscuridad. Al final de la incubación los geles se equilibraron con un amortiguador de fosfatos 0.2 M conteniendo rojo congo al 1%, y se agitaron suavemente durante 15 min. Se removió la solución y se lavó con NaCl 1M hasta que aparecieron las zonas claras. Se midió la actividad tomando los diámetros de las zonas claras y se interpolaron de acuerdo con una curva estándar de actividad de endo- $\beta$ -Mananasa de *Aspergillus niger* (Downie *et al*, 1994).

**N- Extracción y Cuantificación de la Actividad Amilolítica.**

La determinación de la actividad amilolítica se realizó mediante la utilización de dos procedimientos considerando la posibilidad de que la actividad presentará diferencias entre las enzimas durante el desarrollo, la germinación y postgerminación de la semilla. En el primer caso el material se homogeneizó en un amortiguador de acetatos 0.01M pH 6.0 con 0.01 M de CaCl<sub>2</sub>, 0.003M de NaF y 0.005 M de  $\beta$ -mercaptoetanol, utilizando una relación de 0.04g de peso fresco por ml de amortiguador. Posteriormente se incubó en agitación constante a 4°C durante 1 hora, se centrifugó a 10,000 g durante 20 min a 4 °C, y se recuperó el sobrenadante, el cual fue considerado como extracto enzimático (Okamoto y Akazawa, 1979; Beleida y Varriano-Martson, 1981; Abdul-Hussain y Varriano-Martson 1982). Se determinó de la actividad amilolítica utilizando la siguiente secuencia:

- 1- Cuantificación de la actividad total a pH 6.0
- 2- Cuantificación de la actividad termoestable a pH 6.0 (mayoritariamente  $\alpha$ -amilasa), actividad remanente una vez sometido el extracto a 70 °C durante 20 min en amortiguador que contiene CaCl<sub>2</sub> 0.01 M.
- 3- Cuantificación de la actividad total a pH 4.8
- 4- Cuantificación de la actividad termoestable a pH 4.8 (mayoritariamente  $\alpha$ -amilasa), actividad remanente una vez sometido el extracto a 70 °C durante 20 min en amortiguador que contiene CaCl<sub>2</sub> 0.01 M.

La actividad amilolítica se determinó en un ensayo con un volumen final de 1.2 ml que contenía de 100 a 400  $\mu$ l del extracto enzimático crudo, 300  $\mu$ l de almidón soluble Merck (4 mg/ml) en amortiguador de acetatos, CaCl<sub>2</sub> 0.01 M y de azida de sodio 0.02 % a pH 6.0 o 4.8 de acuerdo al extracto a ensayar. Se incubó durante 1,2,5,10,15 min y se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l de la mezcla de reacción, la cual se recibió en un tubo que contenía 20  $\mu$ l de la sol de I<sub>2</sub>-KI acidulada (I<sub>2</sub>: 12.7 g, KI: 30 g, HCl 1N: 2.2 ml, H<sub>2</sub>O: 1,000 ml). Se diluyó la muestra 1:2 y se determinó su absorbencia a 620 nm y la cantidad de almidón se interpoló con una curva estándar de almidón soluble Merck (Díaz-Pontones, 1991).

Homogeneización y solubilización de la enzima.



En amortiguador de Citratos 0.1M y Fosfatos 0.2M pH 7.5



Centrifugación a 1000 g durante 10 min.



Ensayo de difusión en Gel:  
0.1% de GLM y 0.7% de Phytigel



Incubación del gel  
16 hrs a 40 ° C



Tinción del gel  
con Rojo Congo.



Medición de los  
diámetros de difusión

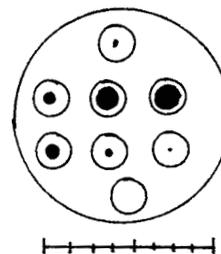
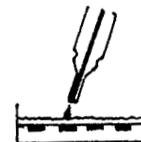
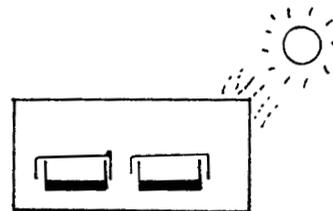


Fig. 2b Diagrama del método de extracción y cuantificación de la actividad de  $\beta$ -mananasa.

Solubilización de la enzima  
en amortiguador de acetatos  
0.01M pH 7.5



Incubación en agitación constante  
a 4°C durante 1 hora



Centrifugación a  
10,000 g durante 20 min.



Condiciones de medición:  
a) Extracto crudo pH 6.0 y 4.8  
b) Fracción termoestable pH 6.0 y 4.8



Desaparición del Almidón  
soluble a distintos tiempos.



Adición de Iodo para la  
formación del complejo  
Alm-Iodo.



Leer absorbencia  
400 nm.

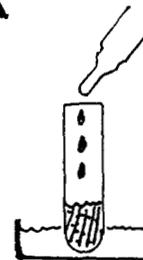
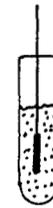


Fig. 2c Diagrama del método de extracción y cuantificación de la actividad amilolítica.

La segunda metodología utilizada consistió en tomar grupos de 5 semillas, las cuales fueron homogeneizadas con 3.5 ml en amortiguador de acetatos 0.1 M a pH 5.6. El homogenado fue centrifugado a 12,000 g durante 20 min. a 2 °C y el sobrenadante fue considerado como extracto crudo. Para determinar la actividad de amilasa soluble se utilizó almidón soluble Sigma al 0.1% en amortiguador de acetatos 0.1M como sustrato. La mezcla de incubación consistió de 300 µl del extracto crudo y 200 µl de sustrato. Se incubó a 30 °C durante 1, 2, 5, 10, 15 min. Al terminó de cada periodo se adicionaron 200 µl de HCl (1N), 500 µl de amortiguador (acetatos 0.1 M pH 5.6) y 20 µl de KI-I<sub>2</sub> (I<sub>2</sub> = 12.7 g y KI= 30 g en 1000 ml). La cantidad de almidón se interpolo con una curva estándar de almidón (modificado de Bewley *et al.*, 1993).

VII.- Resultados

A.- Cuantificación de Carbohidratos.

1.- Durante el desarrollo de *Ipomoea purpurea*.

a.- Desarrollo de la semilla.

b.- Carbohidratos.

2.- Durante la germinación y postgerminación de *Ipomoea purpurea*.

a.- Germinación de la semilla.

b.- Carbohidratos.

B.- Determinación de las actividades enzimáticas.

1.- Durante el desarrollo de *Ipomoea purpurea*.

a.-  $\alpha$ -Galactosidasa y  $\beta$ -Manosidasa.

b.-  $\beta$ -Mananasa.

2.- Durante la germinación y postgerminación de *Ipomoea purpurea*.

a.-  $\alpha$ -Galactosidasa y  $\beta$ -Manosidasa.

b.-  $\beta$ -Mananasa.

c.- Actividad Amilolítica.

**A.- Cuantificación de Carbohidratos**

**1.- Durante el Desarrollo de la Semilla de *Ipomoea purpurea*.**

**a.- Desarrollo de la Semilla.**

El desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea* se realiza en un lapso de 29 a 31 días desde la antesis hasta la semilla madura hidratada. El desarrollo de la semilla se dividió en 10 etapas de acuerdo a su peso fresco (mg-pf) y estado de desarrollo morfológico (Díaz-Pontones, 1992).

**b.- Carbohidratos Solubles.**

Los carbohidratos de la semilla se solubilizaron en etanol al 80%. Posteriormente el extracto se centrifugó y se tomó el sobrenadante para realizar los ensayos. Para la cuantificación de azúcares reductores por antrona, se tomó una alícuota directamente del sobrenadante, pero para el caso de las mediciones acopladas a reacciones enzimáticas se desecó una alícuota del sobrenadante y posteriormente se resuspendió en agua bidestilada.

Inicialmente se midieron los azúcares reductores por el método de antrona utilizando como referencia una curva estándar de glucosa. Los resultados se muestran en la fig. 3. Se encontró que la cantidad de azúcares reductores aumenta gradualmente con respecto al desarrollo de la semilla hasta los 35 mg, disminuyendo en la siguiente etapa y hacia el final del desarrollo aumenta nuevamente hasta alcanzar un máximo en la semilla madura deshidratada.

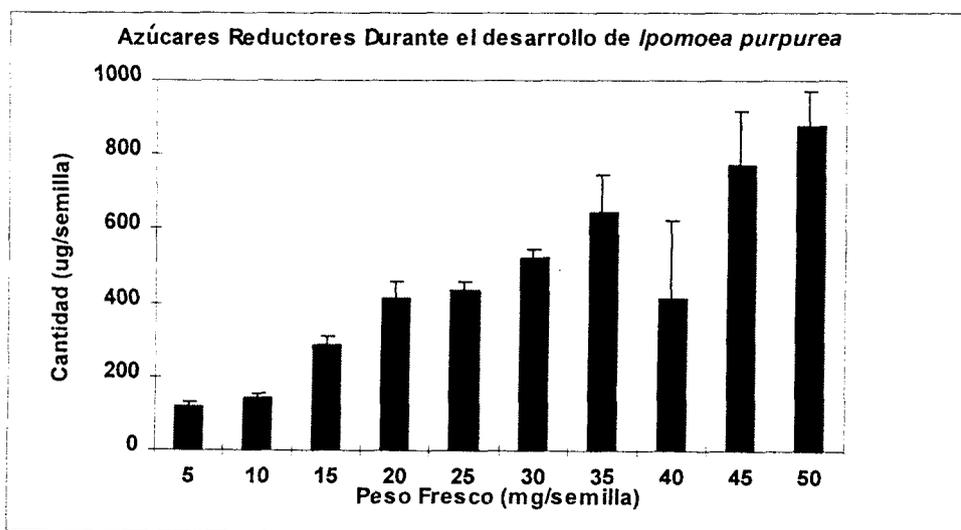


Fig. 3 Cuantificación total de carbohidratos reductores por el método de antrona durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. Se utilizó la glucosa como curva estándar. Los datos representan la media y DS de 4 ensayos

## RESULTADOS

Un análisis cualitativo del tipo de carbohidratos que se podrían encontrar en los extractos de las etapas de desarrollo se realizó con la marcha de pruebas químicas (Tabla 1). La prueba de Fehling fue positiva, lo cual indicó la presencia de azúcares reductores; la prueba de bial-orceinol fue negativa indicando la ausencia de pentosas; las pruebas de difenilamina, Borenfreund, carbazol y cisteína- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fueron positivas por lo que se determinó la presencia de hexosas y ceto hexosas.

MUESTRA	PRUEBAS				
	Fehling	Bial-orcinol	Difenilamina	Carbazol	Cisteina
<b>CONTROL*</b>					
Glucosa	+	-	-	+	+
Fructosa	+	-	+	+	+
Galactosa	+	-	-	+	+
Manosa	+	-	-	+	+
Sacarosa	-	-	+	+	+
Rafinosa	-	-	+	+	+
Estaquirosa	-	-	+	+	+
Maltosa	+	-	-	+	+
Eritrosa	+	-	-	-	-
<b>Problema</b>					
Etapa 35 mg	+	-	+	+	+
Etapa 45 mg	+	-	+	+	+
GLM**	-	-	-	+	+

Tabla 1 Identificación de carbohidratos obtenidos durante el desarrollo de *Ipomoea purpurea* mediante pruebas químicas. Las pruebas de identificación aplicadas fueron: Fehling (detecta azúcares reductores), bial-orcinol (prueba para pentosas) difenilamina y Borenfreund (prueba para ceto hexosas), carbazol y cisteína-ácido sulfúrico (prueba de hexosas).\* Sol 1 mg/ml,\*\* Sol 1 mg/ml de GLM de *I. purpurea*. (-) Reacción negativa y (+) reacción positiva.

Los azúcares solubles en etanol como son sacarosa (Sac), glucosa (Glu), fructosa (Fru), galactosa (Gal) y  $\alpha$ -galactosil oligosacáridos (nRaf) fueron medidos mediante los equivalentes de NADH<sub>2</sub> producto de reacciones enzimáticas acopladas y la cantidad se expresó en  $\mu\text{g/semilla}$  o  $\mu\text{g/estructura}$  (ver sección G e I de métodos). En cada caso se utilizó un estándar en paralelo para verificar que el proceso de extracción y cuantificación fuera el adecuado. En todos los casos se obtuvo un porcentaje de eficiencia en el proceso de extracción y cuantificación mayor o igual al 90%. Los resultados se obtuvieron tanto en semilla completa como por estructura: testa, endospermo y embrión.

La cuantificación de Glu realizada en la semilla completa demostró que esta presenta un máximo hacia la mitad del desarrollo (25 mg), para posteriormente descender (Fig. 4A). A nivel de estructura, la cantidad de Glu presente en el embrión aumenta gradualmente hasta la etapa de 45 mg cuando alcanza su mayor concentración (28  $\mu\text{g/semilla}$ ) y a partir de la cual disminuye (Fig. 4D). El endospermo presenta un comportamiento similar, sin embargo la cantidad de Glu es el doble (Fig. 4C). En la testa la cantidad de Glu desciende de 120 a 60  $\mu\text{g/semilla}$  en la última etapa de desarrollo (Fig. 4B).

## RESULTADOS

La cantidad de Fru durante el desarrollo de la semilla oscila sobre una basal en un valor constante (Fig. 5A), sin embargo los patrones de acumulación son distintos en cada estructura. La Fru en testa a los 30 mg presenta un valor máximo para posteriormente descender y estabilizarse; mientras que endospermo y embrión presentan comportamientos similares a los de Glu en estas dos estructuras, solo que en este caso los valores son menores (Fig. 5B, C y D).

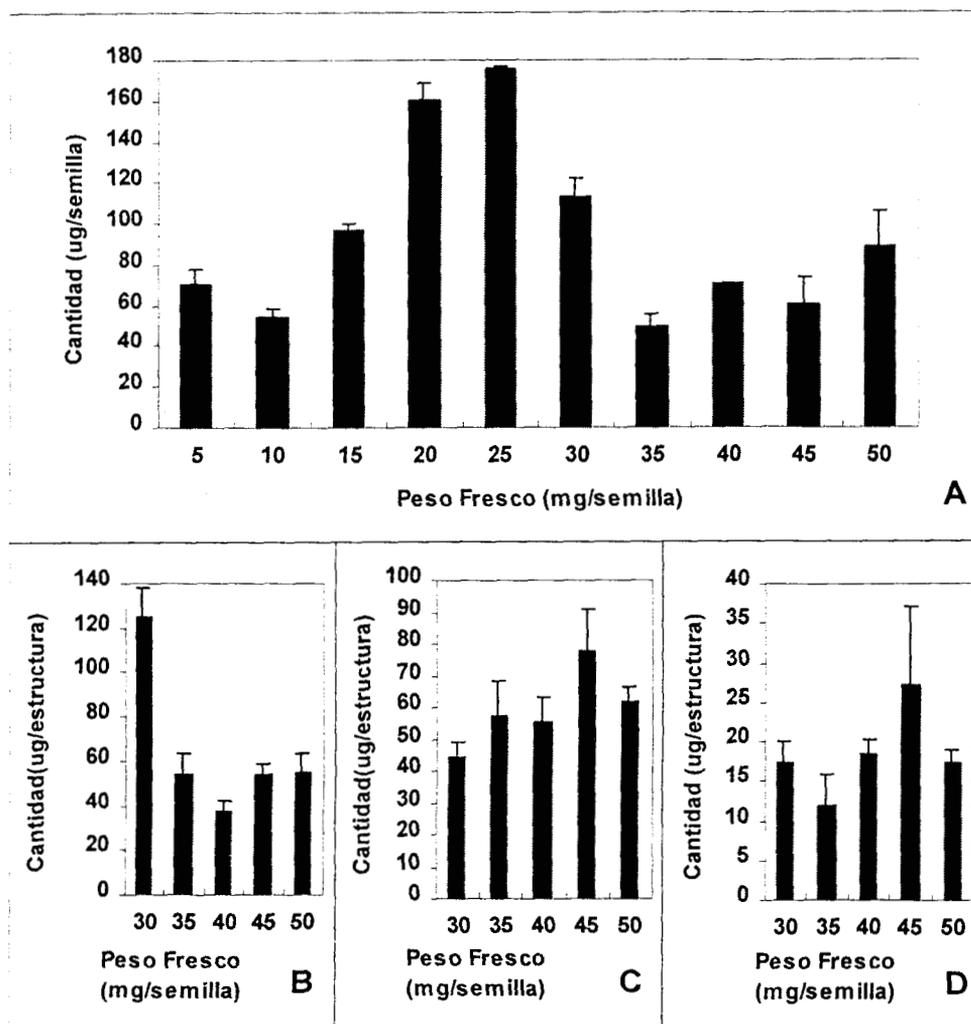


Fig. 4 Cantidad de glucosa durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. A- Determinación en la semilla completa, B - Testa, C - Endospermo y D - Embrión. La cuantificación se determinó mediante los equivalentes de NADH producidos en reacciones acopladas (ver métodos para más detalles). Los datos representan la media y DS de 4 ensayos.

Durante el desarrollo de la semilla se encontraron  $\alpha$ -galactosil oligosacáridos (nRaf). El patrón de acumulación indica que en la semilla completa el nRaf tiene un primer máximo a los 20 mg, un segundo a los 35mg y un tercer máximo hacia los 45 mg (Fig. 6A); además, la concentración se encuentra un orden de magnitud menor que en el caso de

## RESULTADOS

Glu. Los estudios por estructura demostraron que este  $\alpha$ -galactosil oligosacárido se acumula de manera principal en el endospermo y el embrión, en el primer caso se presenta un máximo único hacia los 40 mg, mientras que el embrión se acumula a partir de esta etapa para posteriormente disminuir. Cabe mencionar que en la testa se acumula únicamente en la etapa de 35 y 40 mg con la menor concentración de las tres estructuras (Fig. 6B, C y D).

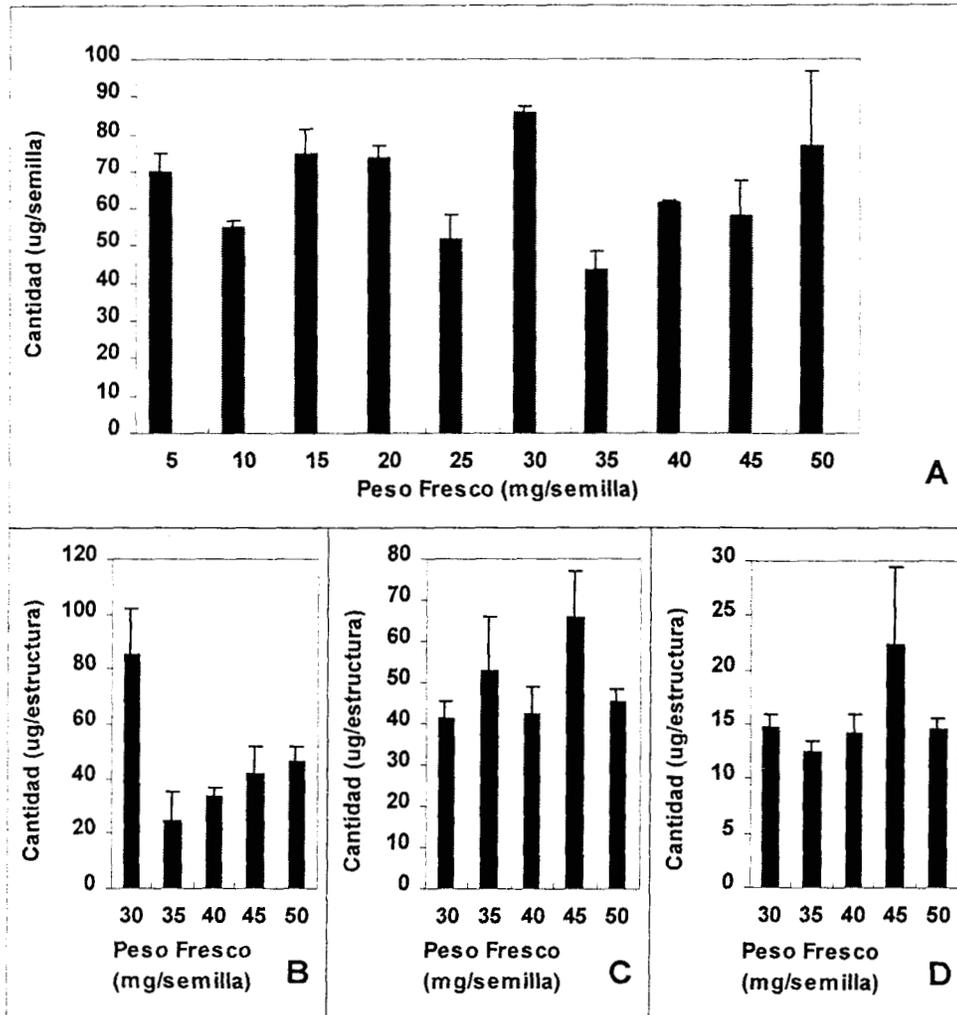


Fig. 5 Cantidad de fructosa durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. A- Determinación en la semilla completa, B - Testa, C - Endospermo y D - Embrión. La cuantificación se determinó mediante los equivalentes de NADH producidos en reacciones acopladas (ver métodos para más detalles). Los datos representan la media y DS de 4 ensayos

## RESULTADOS

La cantidad de galactosa (Gal) cuantificada durante el desarrollo presenta en la semilla completa un máximo en la etapa de 35 mg para posteriormente descender en 45 mg y alcanzar un segundo máximo en la última etapa de estudio (Fig. 7A). Los resultados por estructura muestran que en la testa se presenta únicamente en las últimas tres etapas de estudio con cantidades constantes (Fig. 7B). En el endospermo la etapa de 30 mg presenta un valor máximo para después descender y desaparecer al final del desarrollo, en estas dos estructuras las cantidades máximas son similares. En embrión, la acumulación de Gal presenta un máximo en la etapa de 40 mg y posteriormente oscila sobre un valor menor (Fig. 7C y D).

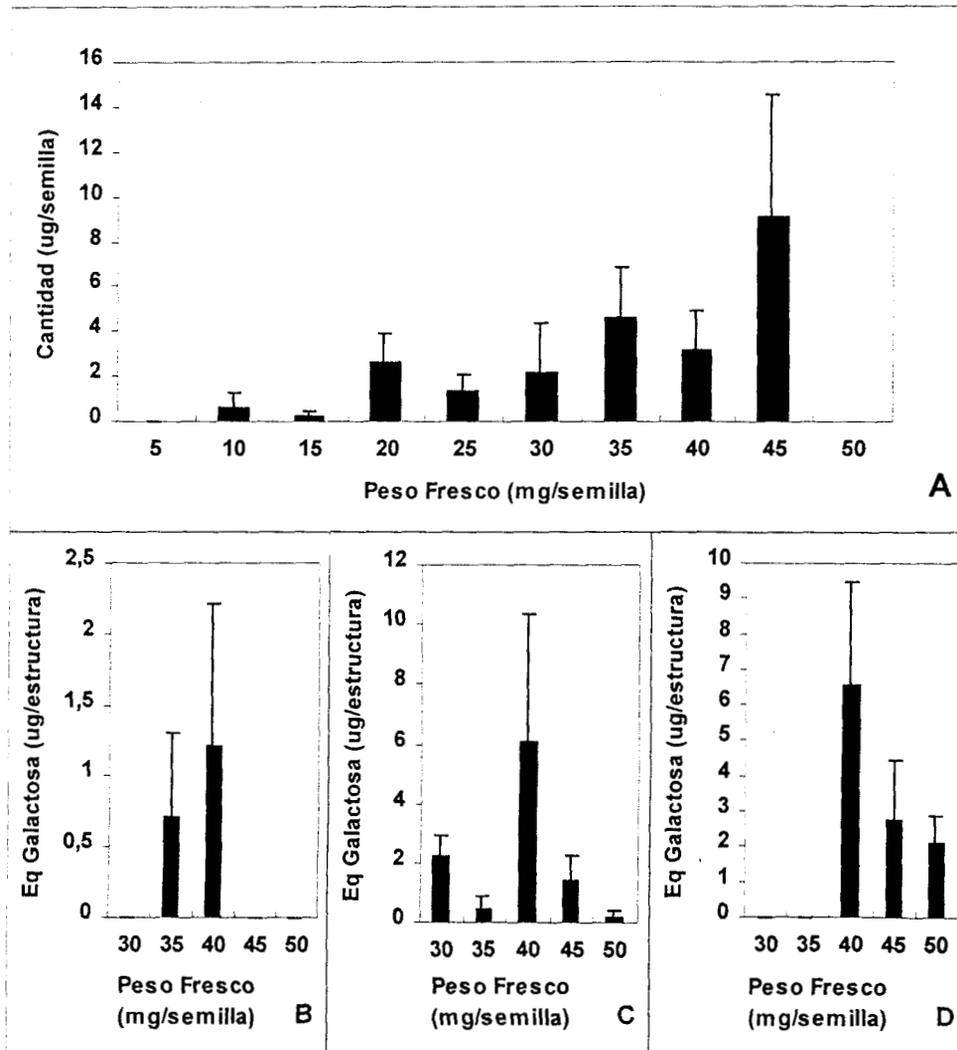


Fig. 6 Cuantificación de  $\alpha$ -galactosil oligosacárido durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. A- Determinación en la semilla completa, B- Testa, C- Endospermo y D - Embrión. La cuantificación se determinó mediante los equivalentes de NADH producidos en reacciones acopladas (ver métodos). Los datos representan la media y DS de 4 ensayos

222872

## RESULTADOS

Para el caso de sacarosa (Sac) se observó que en la semilla completa aparece una poza cuantificable a partir de la etapa de 35 mg, presentando posteriormente un ligero descenso en la siguiente etapa, a partir de la cual aumenta nuevamente hasta alcanzar un máximo en la etapa de 50 mg (Fig. 8A), el descenso en la etapa de 40 mg coincide con el descenso en los azúcares reductores totales. Los estudios por estructura demuestran que la Sac se acumula en testa, endospermo y embrión a partir de la etapa de 30 mg (Fig. 8B, C y D). A nivel de testa aumenta gradualmente hasta alcanzar una concentración de 120  $\mu\text{g}/\text{semilla}$ . En el endospermo, las concentraciones se encuentran entre 250 y 300  $\mu\text{g}/\text{semilla}$ , siendo esta estructura la que contiene la mayor cantidad. Sin embargo, en el embrión solo se presenta un máximo en la etapa de 40 mg, con una concentración similar a la testa, a partir de esta etapa la cantidad se mantiene constante.

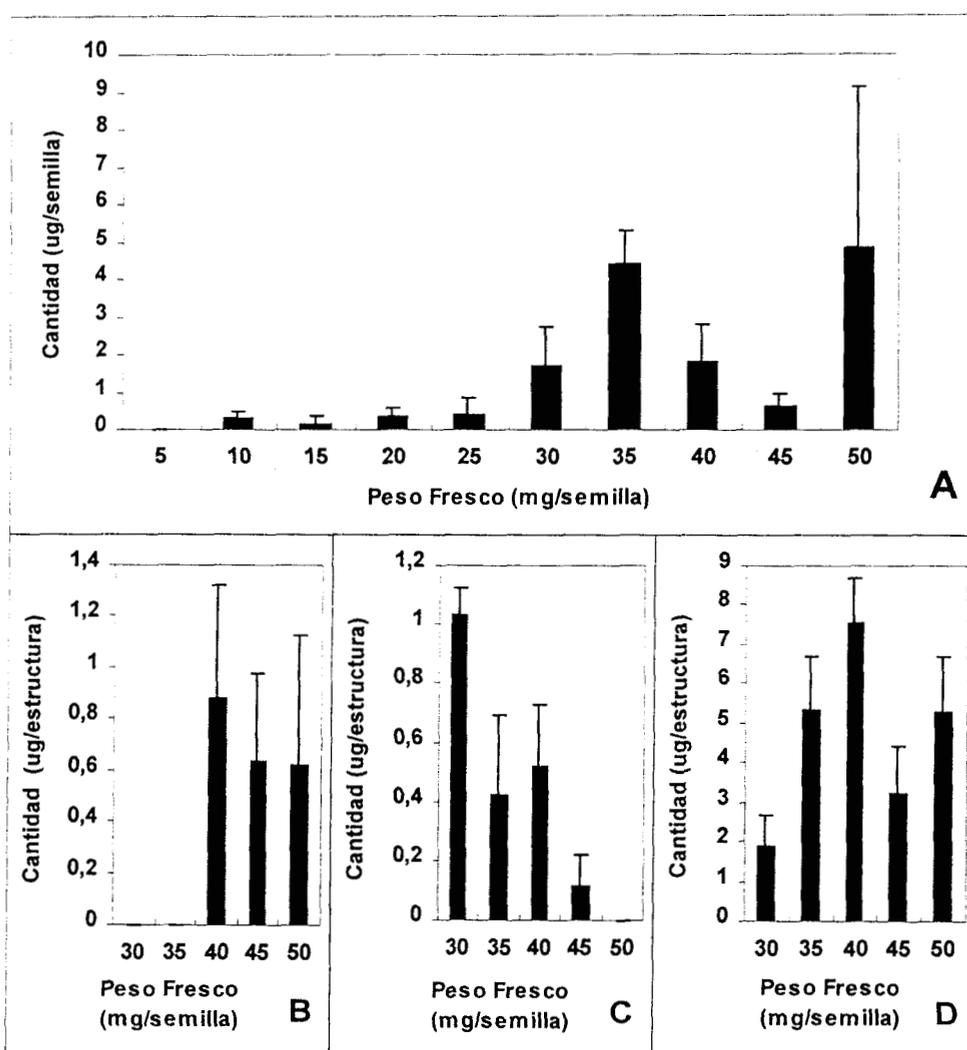


Fig. 7 Cantidad de galactosa durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. A -Determinación en la semilla completa, B - Testa, C - Endospermo y D - Embrión. La cuantificación se determinó mediante los equivalentes de NADH producidos en reacciones acopladas. Los datos representan la media y DS de 4 ensayos

El método empleado para la obtención del polisacárido galactomanano (GLM) demostró tener un rendimiento del 90% cuando se utilizó un estándar en paralelo de GLM de *Turbina corymbosa* (donado por la Dra. Alicia Brechú Franco). La cuantificación de GLM se realizó por dos métodos: gravimétrico y equivalentes de galactosa, expresados en mg/semilla y mg/estructura respectivamente. Los resultados obtenidos por el método gravimétrico en la semilla completa demuestran que el GLM se detecta desde la etapa de 25 mg a partir de la cual aumenta hasta obtener un máximo a los 50 mg. Así mismo, el análisis por estructura demostró que en las mismas etapas de desarrollo el GLM únicamente se encuentra en el endospermo, no así en el embrión, ni en la cubierta seminal (Fig. 9A).

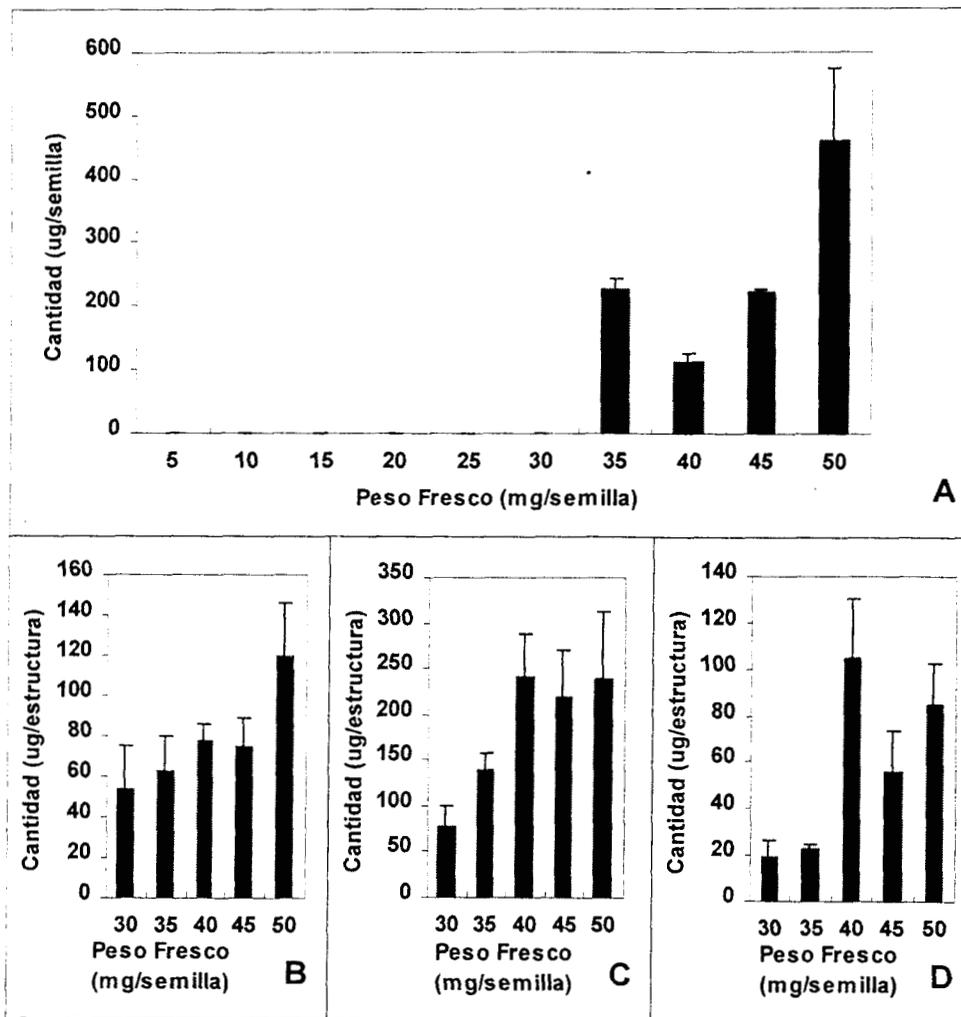


Fig. 8 Cantidad de sacarosa durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. A -Determinación en la semilla completa, B -Testa, C -Endospermo y D -Embrión. La cuantificación se determinó mediante los equivalentes de NADH producidos en reacciones acopladas (ver métodos ). Los datos representan la media y DS de 4 ensayos

## RESULTADOS

La cuantificación de GLM mediante los equivalentes de galactosa se presenta en la figura 9B. Para esta cuantificación el GLM por este método se somete a hidrólisis en presencia de  $\alpha$ -galactosidasa (ver sección J de métodos). El GLM se detectó desde la etapa de 25 mg que corresponde a la mitad del desarrollo, hasta alcanzar un máximo en la semilla madura hidratada. Los resultados obtenidos tanto en la semilla completa como en el endospermo presentan la misma tendencia. En la semilla madura hidratada el polisacárido de GLM representa aproximadamente el 18.8% del peso fresco. Por otro lado la hidrólisis ácida y el corrimiento en cromatografía en placa fina demostró que a partir de los 25 mg el GLM únicamente posee galactosa y manosa, no detectándose cantidades apreciables de glucosa ni por TLC ni mediante pruebas enzimáticas.

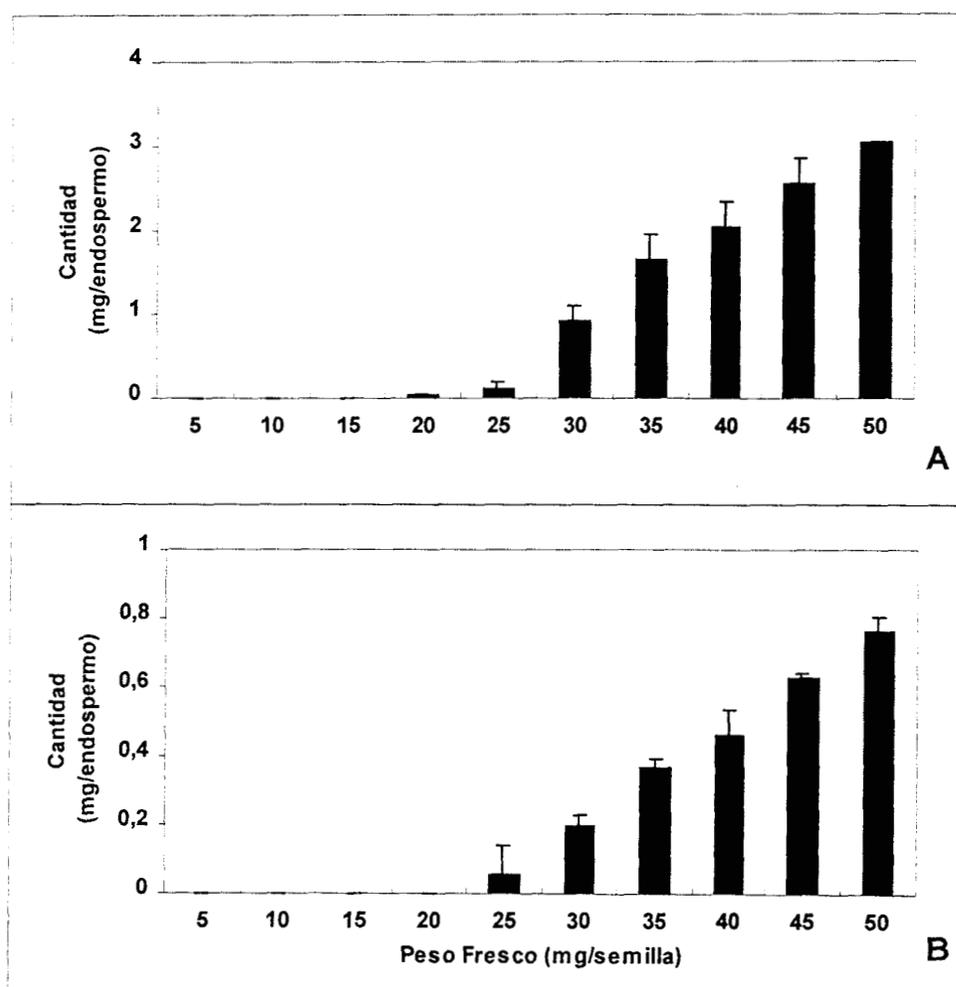


Fig. 9 Cuantificación de galactomanano durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. A- Determinación por el método gravimétrico y B- Determinación por el método de equivalentes de galactosa a nivel del endospermo (ver métodos). Los ensayos representan la media y DS de 4 ensayos.

Las diversas pruebas realizadas con el extracto de galactomanano en la marcha para identificar monosacáridos se observan en la tabla 1. La prueba de Fehling fue negativa. Las pruebas para pentosas también fueron negativas y las pruebas para hexosas resultaron positivas.

La fig. 10 resume las tendencias de los carbohidratos solubles y GLM durante el desarrollo de la semilla, estos patrones permiten considerar las posibles transformaciones durante el desarrollo de la semilla y su función en la maduración de la misma.

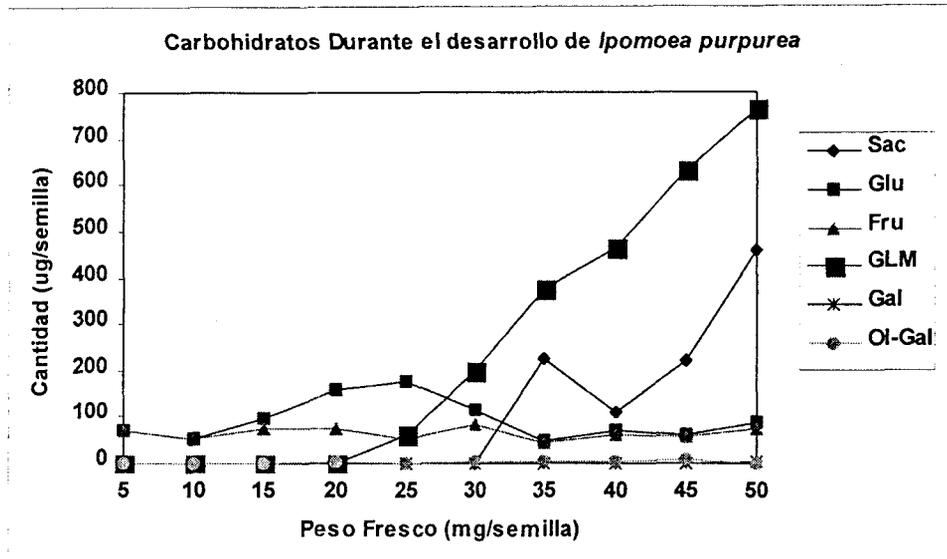


Fig. 10 Resumen del contenido de carbohidratos durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. Se presenta solo la media de los datos de la semilla completa. Para el caso de galactomanano se utilizan los equivalentes de galactosa. Ol-Gal = nRaf.

2.- Durante la Germinación y Postgerminación de *Ipomoea purpurea*.

a.- Germinación de la Semilla.

El proceso de germinación de *I. purpurea* se realizó inicialmente escarificando a las semillas por la región micropilar y desinfectándolas con hipoclorito de sodio. Las semillas se germinaron en condiciones de obscuridad a 25 °C. El intervalo de imbibición fue de 0 hasta las 72 hrs. Para el caso de los estudios por estructura a 0 hrs de imbibición se realizó la escarificación, la esterilización y se colocaron 12 hrs en imbibición a 4 °C, esto con el fin de facilitar la separación de estructuras.

Durante el proceso de imbibición se observa que existe un incremento en el peso fresco, teniendo un máximo al final del periodo de estudio (Fig. 11). El peso representado a las cero horas de imbibición es el peso de la semilla madura deshidratada, la cual tiene un valor que fluctúa entre 16 y 18 mg/semilla. Cuando se observa el peso seco durante el mismo periodo (Fig. 12) se aprecia que existe una tendencia descendente, sin embargo estadísticamente no existe diferencia significativa (  $p < 0.05$  ). A partir de estos resultados se

estableció que el periodo de germinación corresponde de las 0 a las 24 hrs de imbibición, la postgerminación temprana de las 24 a las 48 hrs y la postgerminación tardía de las 48 a las 72 hrs de imbibición.

Para cada tiempo de imbibición se tomó la longitud de la radícula (expresada en cm/semilla), el peso fresco y el peso seco (expresado como mg/semilla), este último se realizó sometiendo los germinados a desecación rápida en sílica gel hasta obtener un peso constante. De esta manera se obtuvo que la protrusión de la radícula se presenta entre las 12 y 24 hrs de imbibición. Esta es visible entre las 12 y 18 hrs y es posible medirla a las 24 hrs. A partir de las 24hrs se presenta un aumento gradual en la longitud de la radícula con respecto al tiempo de imbibición, hasta alcanzar en promedio 8 cm a las 72 hrs (Fig. 13).

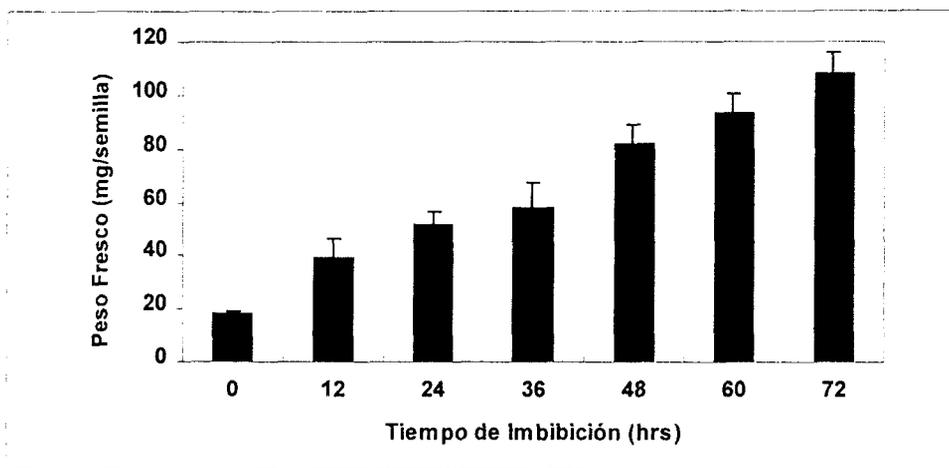


Fig. 11 Determinación del peso fresco durante la germinación y postgerminación de *Ipomoea purpurea*. La determinación se realizó tomando el peso fresco de las semillas al completar el tiempo de imbibición. Los datos representan la media y DS de al menos 6 ensayos.

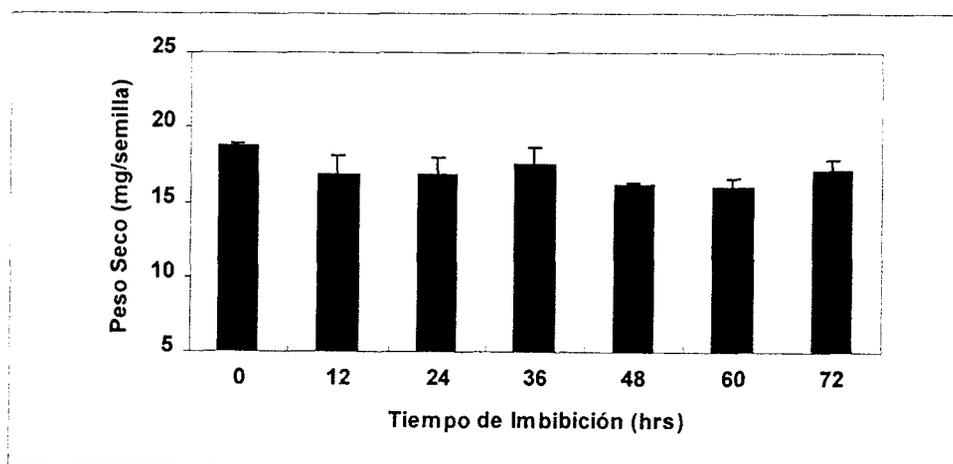


Fig. 12 Determinación del peso seco durante la germinación y postgerminación de *Ipomoea purpurea*. La determinación se realizó tomando el peso seco de las semillas después de someterlas a desecación rápida. Los datos representan la media y DS de al menos 6 ensayos.

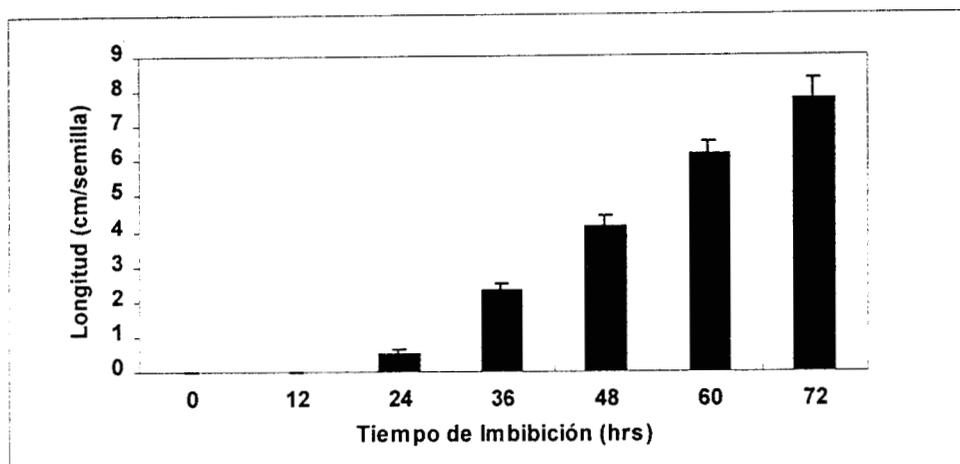


Fig. 13 Determinación de la longitud de la radícula durante la postgerminación de *Ipomoea purpurea*. La determinación se realizó tomando la longitud de la radícula a los distintos tiempos de imbibición.

#### b.- Carbohidratos.

La cuantificación de carbohidratos solubles durante la germinación y postgerminación se realizó tanto en el germinado completo como por estructura: testa-endospermo y embrión-plántula. Los carbohidratos solubles cuantificados fueron nRaf, Gal, Sac, Glu y Fru, además de GLM y almidón (Alm) los cuales se expresaron en mg/semilla o  $\mu\text{g}/\text{semilla}$ . Durante la fase de germinación se observó que se consume únicamente el  $\alpha$ -galactosil oligosacárido. La cantidad de nRaf encontrado a las 0 hrs de imbibición (semilla madura deshidratada) es tres órdenes de magnitud mayor al encontrado en la semilla madura hidratada (Fig. 14 y 22). La proporción Sac:Gal determinada para este oligosacárido por pruebas enzimáticas fue de 1:2, por lo tanto se puede considerar que este oligosacárido es verbascosa; el estudio por estructura demostró que el nRaf se localiza únicamente en el embrión, desciende hacia las 24 hrs y desaparece totalmente a las 36 hrs de imbibición (Fig. 14).

La cantidad de galactomanano detectado entre la semilla madura hidratada con respecto a la semilla madura deshidratada, demuestra un ligero incremento, indicando que en la fase intermedia (desección) este polisacárido continúa su acumulación (Fig. 22). Durante la fase de germinación, la cantidad de GLM medida por el método gravimétrico se mantiene constante, posteriormente este polisacárido disminuye al inicio de la postgerminación, es decir entre las 24 y 36 hrs de imbibición hasta desaparecer completamente hacia las 72 hrs (Fig. 15A). De la misma forma que durante el desarrollo de la semilla, el GLM se localizó únicamente en el endospermo. En cambio la medición de equivalentes de galactosa demostró que el GLM comienza a disminuir entre las 12 y 24 hrs hasta desaparecer prácticamente a las 48 hrs a nivel del endospermo (Fig. 15B), es decir se detecta remoción de galactosa 12 hrs antes del inicio de la degradación del endospermo con este método en comparación con el gravimétrico. (Fig. 15A y B).

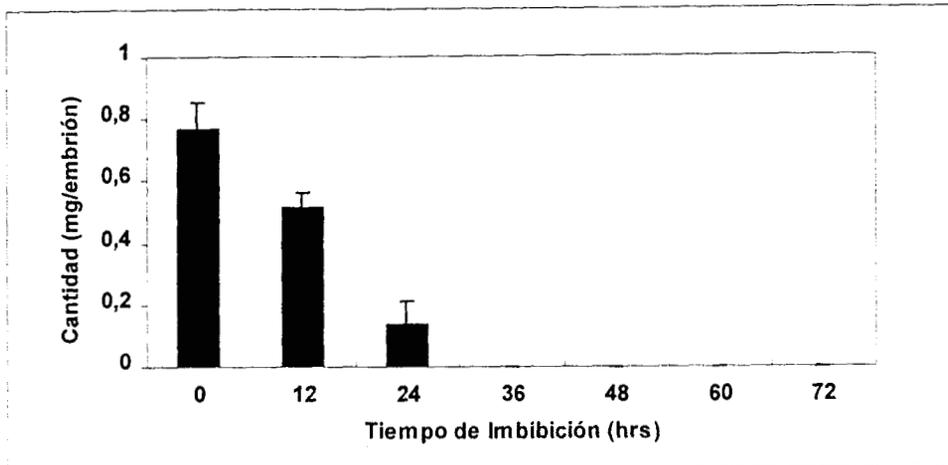


Fig. 14 Cuantificación de  $\alpha$ -galactosil oligosacárido en Embrión durante la germinación y postgerminación de *Ipomoea purpurea*. La cuantificación se determinó mediante los equivalentes de NADH producidos en reacciones acopladas. Los datos representan la media y DS de 4 ensayos.

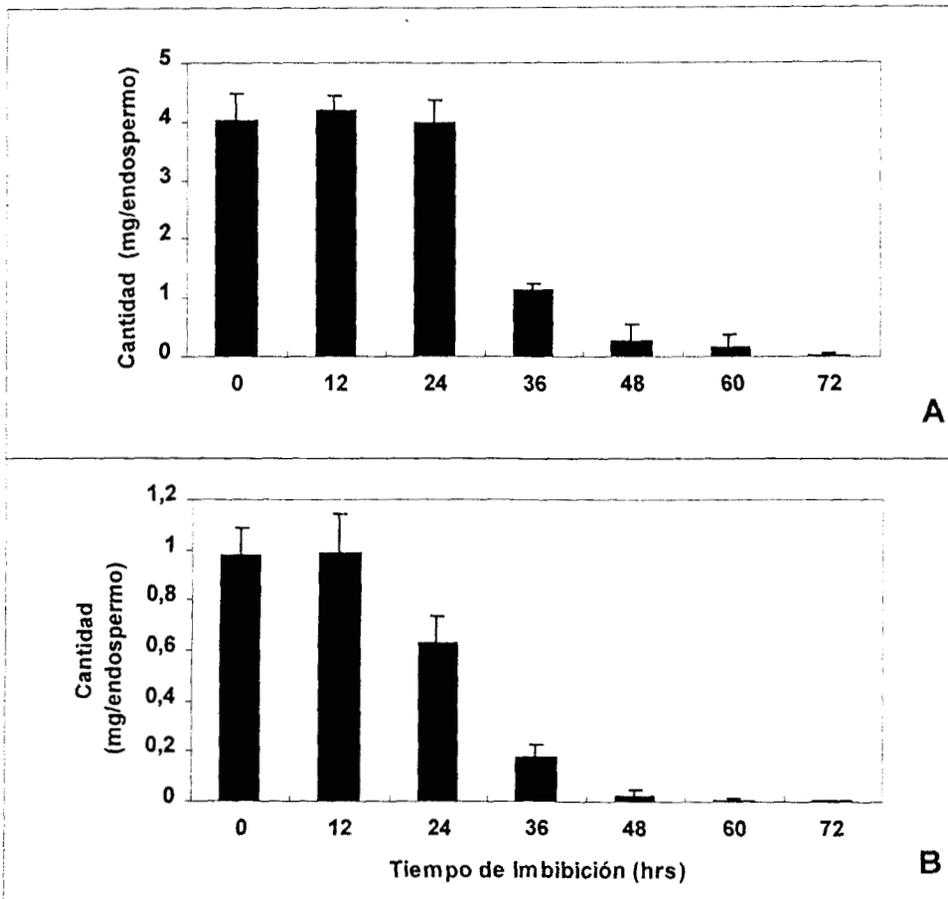


Fig.15 Cuantificación de galactomanano en endospermo durante la germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*. A - Determinación por el método gravimétrico y B- Determinación por el método de equivalente de galactosa (ver métodos). Los ensayos representan la media y DS de 4 ensayos.

## RESULTADOS

El contenido de Gal en el germinado presenta dos máximos, el primero a las 24 hrs para posteriormente disminuir en las 36 hrs, y el segundo hacia las 72 hrs donde alcanza su máxima concentración. La Gal solo se detectó en el embrión-plántula y su concentración oscila entre 5 y 40  $\mu\text{g}/\text{semilla}$  (Fig. 16). Durante la fase medida de postgerminación la Sac que comienza a acumularse a partir de las 12 hrs alcanza un máximo entre las 36 y 48 hrs, después de este periodo la cantidad disminuye hacia las 72 hrs. El patrón de acumulación por lo tanto es transitorio. Este disacárido solo se detectó en el embrión-plantula (Fig. 17).

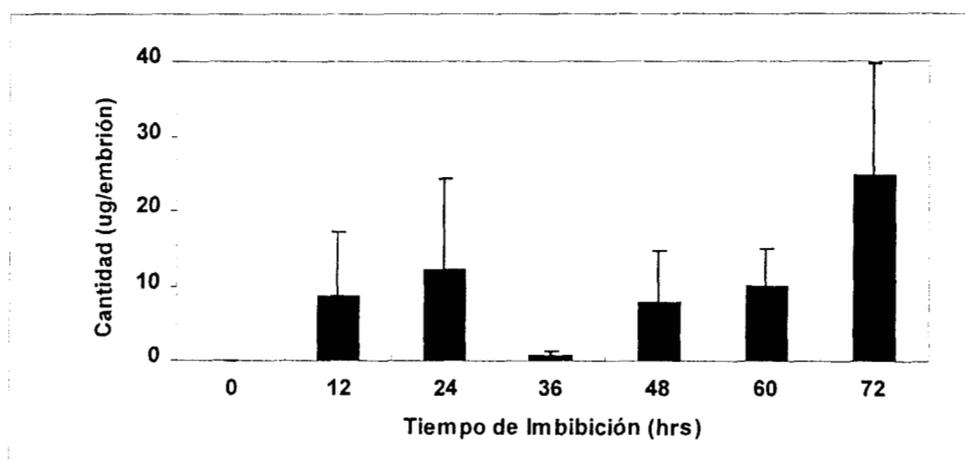


Fig. 16 Cantidad de galactosa en embrión durante la germinación y postgerminación de *Ipomoea purpurea*. La cuantificación se determinó mediante los equivalentes de NADH producidos en reacciones acopladas (ver métodos). Los datos representan la media y DS de 4 ensayos

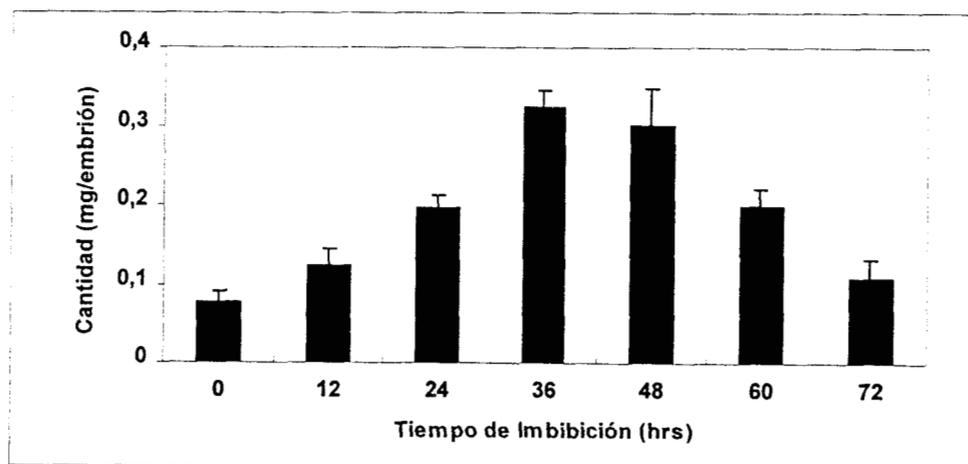


Fig.17 Cantidad de sacarosa en embrión durante la germinación y postgerminación de *Ipomoea purpurea*. Los datos representan la media y DS de 4 ensayos.

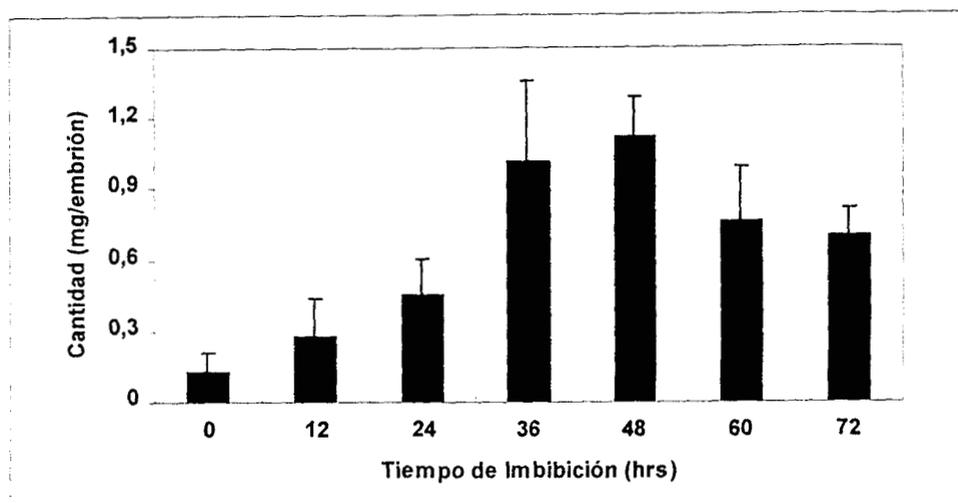


Fig. 18 Cantidad de almidón en embrión durante la germinación y postgerminación de *Ipomoea purpurea*. La determinación se realizó por el método iodométrico. Se representa la media y DS de 6 ensayos.

Simultáneo a la acumulación de Sac se da también un aumento en el Alm. La determinación de Alm se realizó utilizando la técnica de gelificación en KOH y posteriormente se midió por el método iodométrico. El Alm se detectó únicamente en el embrión-plántula siendo una acumulación transitoria. El Alm inicia su acumulación a las 24 hrs hasta alcanzar un máximo entre las 36 y 48 hrs (110  $\mu\text{g}$ /estructura) a partir de la cual disminuye hasta el final del tiempo de imbibición (Fig. 18). Cabe mencionar que el Alm alcanza concentraciones muy parecidas a la que prevalecen durante la primera fase de desarrollo de la semilla a nivel de testa (Fig. 22).

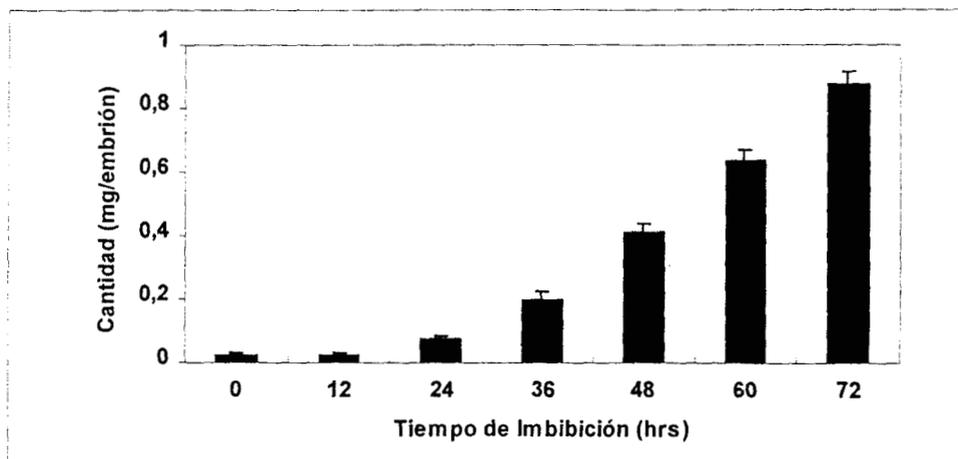


Fig. 19 Cantidad de glucosa en embrión durante la germinación y postgerminación de *Ipomoea purpurea*. La cuantificación se determinó mediante los equivalentes de NADH producto de reacciones acopladas. Los datos representan la media y DS de 4 ensayos.

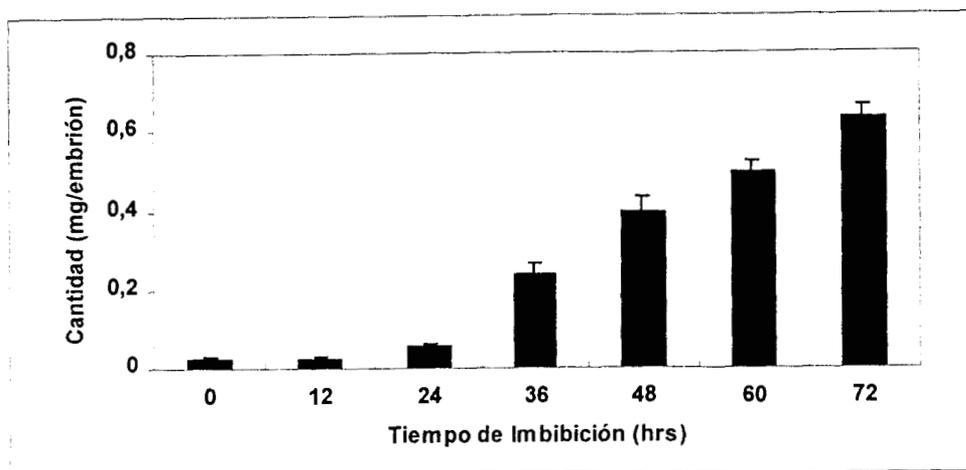


Fig. 20 Cantidad de fructosa en embrión durante la germinación y postgerminación de *Ipomoea purpurea*. La cuantificación se determinó mediante los equivalentes de NADH producto de reacciones acopladas. Los datos representan la media y DS de 4 ensayos.

Por otro lado los monosacáridos Glu y Fru se detectan desde las 0 hrs de imbibición, durante la germinación su concentración se mantiene baja, sin embargo a partir del inicio de la postgerminación comienzan a acumularse hasta alcanzar máximos hacia las 72 hrs. La Glu y Fru se localizaron únicamente a nivel del embrión-plántula (Fig. 19 y 20).

A manera de resumen la fig. 21 presenta los comportamientos de acumulación de los carbohidratos solubles, GLM y Alm medidos durante la germinación y postgerminación. Los comportamientos de acumulación y desaparición de carbohidratos durante el desarrollo, germinación y postgerminación se presentan en la fig. 22. El periodo de desecación se muestra con el fin de considerar los posibles cambios de estas pozas.

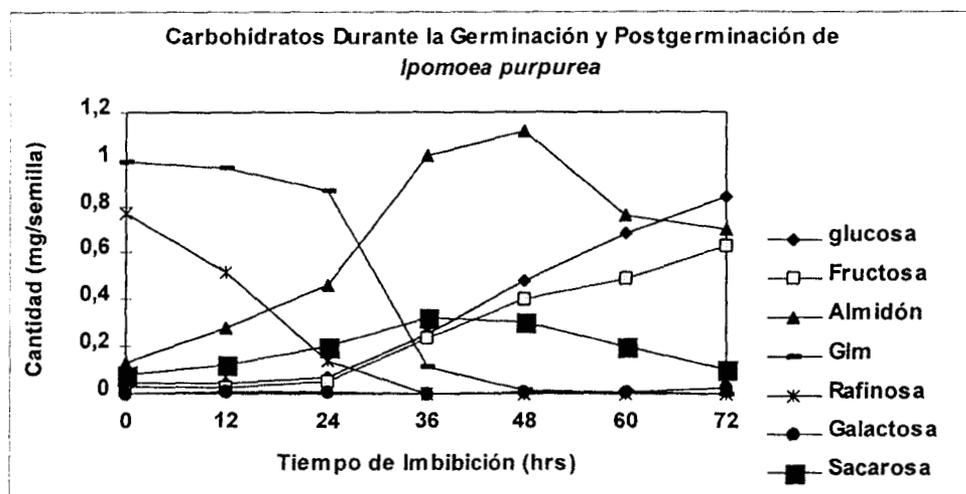


Fig. 21 Resumen de carbohidratos durante la germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*. Se presenta solo la media de los datos. En el caso de galactomanano se utiliza los equivalentes de galactosa.

222372

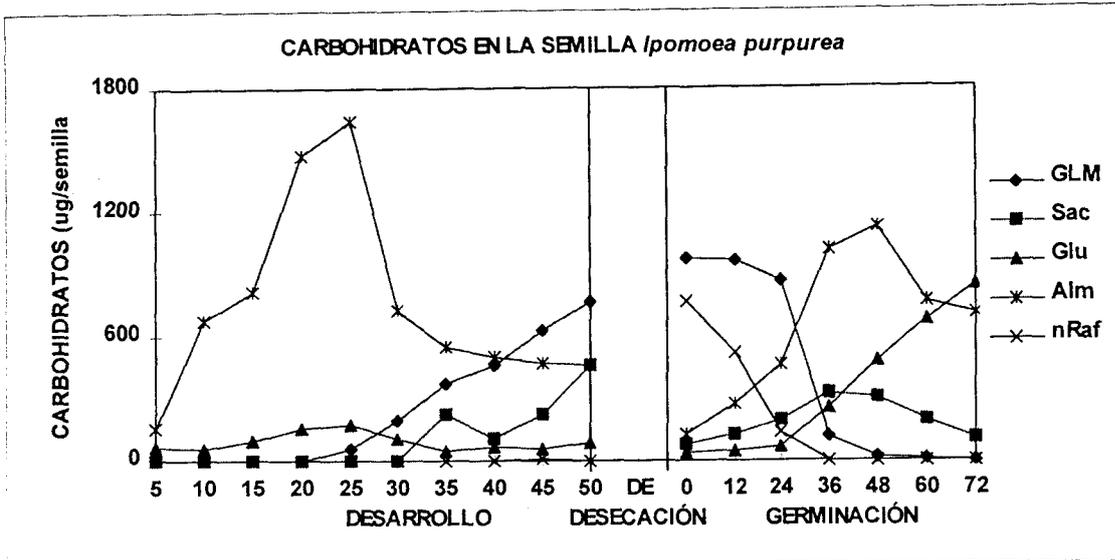


Fig. 22 Resumen de carbohidratos durante el desarrollo, desecación, germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*. Se presenta solo la media de los datos de la semilla completa. En el caso de GLM se utiliza los equivalentes de galactosa.

## B.- Determinación de las Actividades Enzimáticas

### 1.- Durante el Desarrollo de *Ipomoea purpurea*.

#### a.- $\alpha$ -Galactosidasa y $\beta$ -Manosidasa.

Durante el desarrollo de la semilla se midieron la actividad de  $\alpha$ -Galactosidasa y  $\beta$ -Manosidasa y  $\beta$ -Mananasa. La extracción de las enzimas se realizó utilizando un amortiguador de citratos-fosfatos a pH 5.0 y tomando el sobrenadante para realizar la mediciones con los sustratos PNPG y PNPM. Inicialmente se determinó el tiempo idóneo de reacción de cada enzima. Para  $\alpha$ -Galactosidasa y  $\beta$ -Manosidasa durante el desarrollo el tiempo fue de 30 min. La actividad de las enzimas se expresó en unidades internacionales por semilla o por estructura.

La actividad de  $\alpha$ -Galactosidasa se detectó desde la primera etapa de desarrollo en la semilla completa, hasta obtener un máximo en la etapa de 45 mg, a partir de la cual tiene un ligero decremento (Fig. 23A) Los estudios por estructura demostraron que en la testa la actividad es constante (Fig. 23B) a partir de los 30 mg hasta el final del desarrollo. En endospermo y embrión la actividad de esta enzima aumenta gradualmente hasta alcanzar un máximo a los 50 mg (Fig. 23C y D), siendo mayor la actividad en el embrión (Fig. 24). Por lo tanto se puede establecer que la actividad de esta enzima se debe principalmente a la presentada a nivel de testa y embrión.

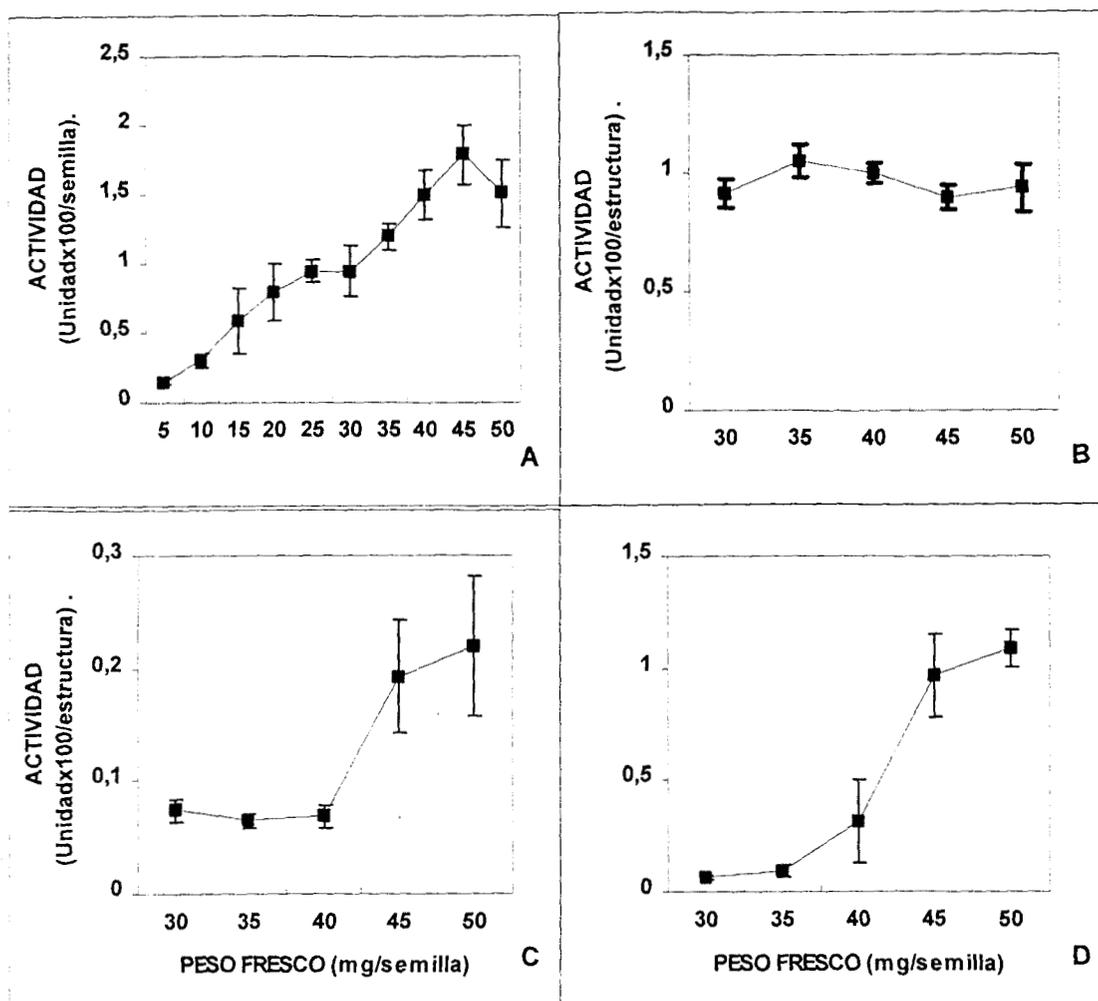


Fig. 23 Cambios en la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. Los datos representan la media y DS de 4 ensayos. A) Total, B) TES, C) END y D) EMB.

Asimismo al medir la actividad de  $\beta$ -Manosidasa se encontró que en semilla completa la actividad se presenta desde el inicio del desarrollo y aumenta gradualmente hasta los 45 mg-pf (Fig. 25A), comportamiento similar al presentado por la  $\alpha$ -Galactosidasa (Fig. 23). La disertación por estructura indica que la actividad de esta enzima en testa es baja y se mantiene constante en las etapas de estudio (Fig. 25B). A diferencia de lo encontrado en la medición de  $\alpha$ -Galactosidasa, el endospermo presenta una actividad mayor de  $\beta$ -Manosidasa (Fig. 25C), la cual presenta un máximo hacia la etapa de 50 mg. Este comportamiento se repite a nivel del embrión para la misma enzima y los valores de actividad son similares (Fig. 25D). De esta manera se puede observar que la actividad de  $\beta$ -manosidasa se localiza principalmente en las estructuras de endospermo y embrión (Fig. 26).

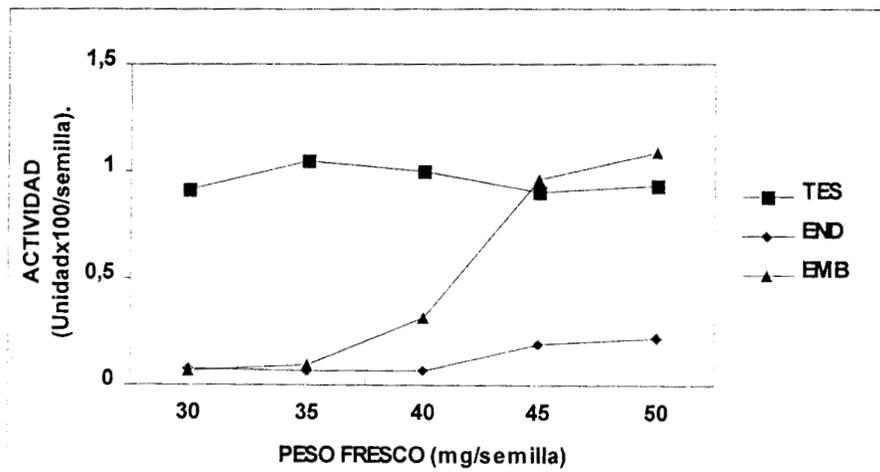


Fig. 24 Comparación en la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa por estructura durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. Se presenta la media de los datos. TES= testa, END= endospermo y EMB= embrión.

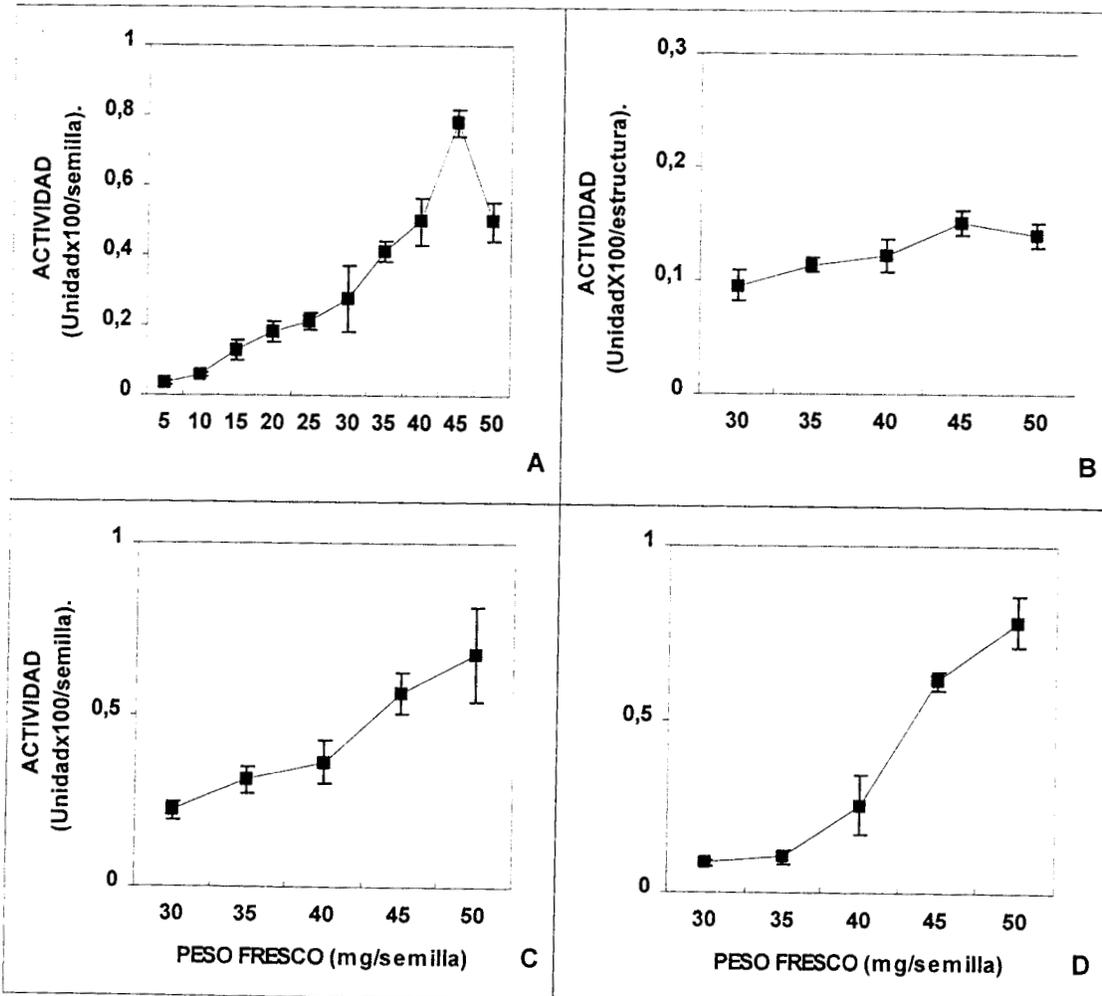


Fig. 25 Cambios en la actividad de  $\beta$ -manosidasa durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. Los datos representan la media y DS de 4 ensayos. A) Total, B) TES, C) END y D) EMB.

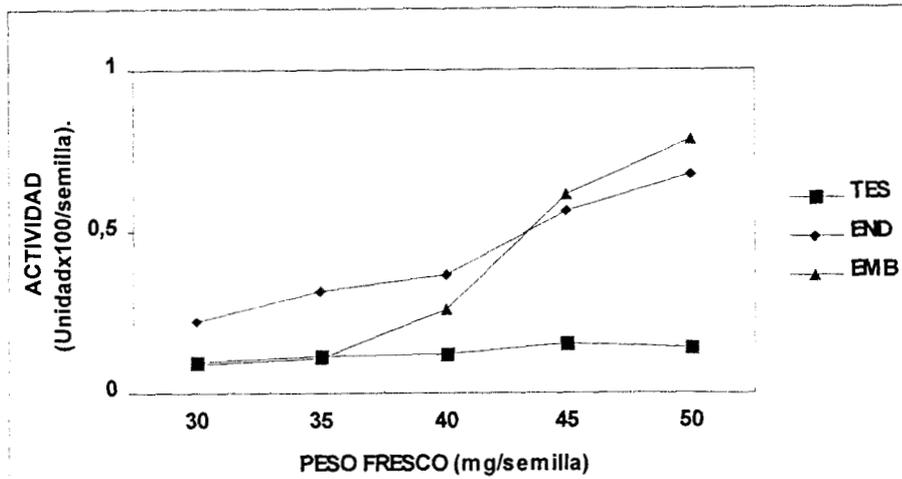


Fig. 26 Comparación en la actividad de  $\beta$ -manosidasa por estructura durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. Se presenta la media de los datos. TES= testa, END= endospermo y EMB= Embrión.

**b.-  $\beta$ -Mananasa.**

La determinación de la actividad de  $\beta$ -Mananasa se realizó con ensayos de difusión de la actividad en geles que contienen como sustrato GLM proveniente de semillas maduras deshidratadas de *Ipomoea purpurea*. La actividad se interpoló a una curva estándar de endo- $\beta$ -Mananasa proveniente de *Aspegillus niger* (Megazima International Ireland Ltd.).

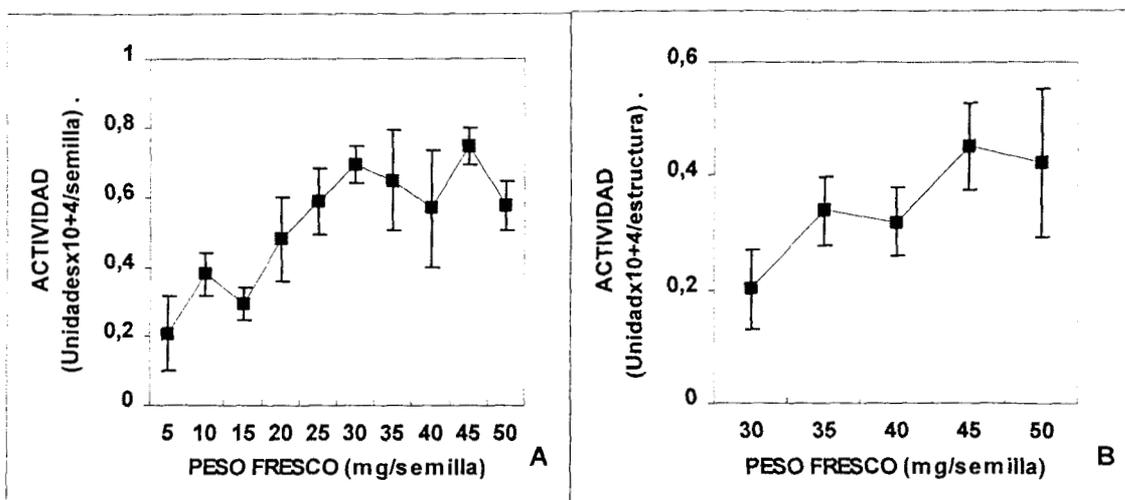


Fig. 27 Cambios en la actividad de  $\beta$ -mananasa durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. Los datos representan la media y DS de 4 ensayos. A) actividad total y B) en TES.

Se detectó una actividad baja de  $\beta$ -Mananasa durante el desarrollo de la semilla, la cual presenta en general un comportamiento ascendente, pero con una alta variabilidad entre ensayos, y se localiza exclusivamente en la testa (Fig. 27A y B). La actividad de esta enzima es dos órdenes de magnitud menor que en el caso de  $\alpha$ -Galactosidasa. Sin embargo no se detectó actividad de  $\beta$ -Mananasa cuando se utilizó GLM obtenido de algunas etapas del desarrollo de la semilla (Datos no mostrados). La figura 28 muestra los comportamientos comparativos de las actividades de enzimas hidrolíticas durante el desarrollo de la semilla.

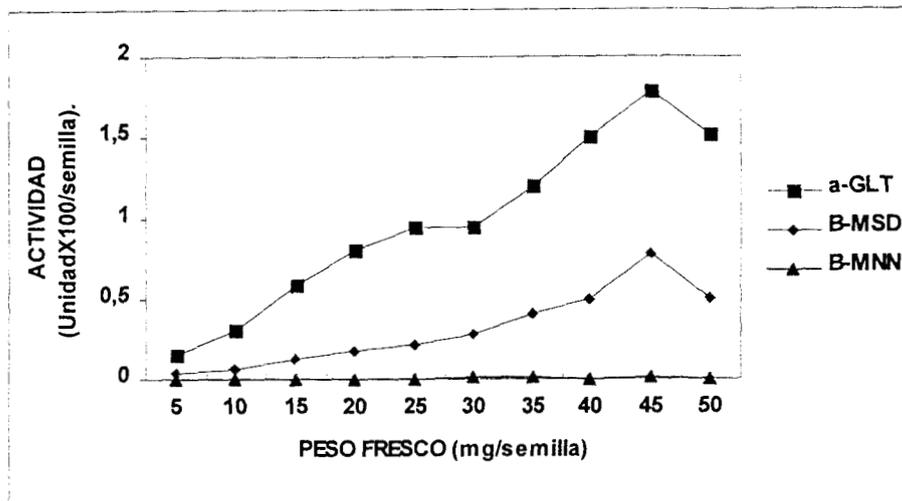


Fig. 28 Cambios en la actividad de enzimas hidrolíticas de GLM durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. a-GLT=  $\alpha$ -galactosidasa, B-MSD=  $\beta$ -manosidasa y B-MNN=  $\beta$ -mananasa.

## 2.- Durante la Germinación y Postgerminación de *Ipomoea purpurea*.

### a.- $\alpha$ -Galactosidasa y $\beta$ -Manosidasa.

Durante los procesos de germinación y postgerminación se determinaron los niveles de actividad de  $\alpha$ -Galactosidasa,  $\beta$ -Manosidasa y  $\beta$ -Mananasa. La extracción y medición de la actividad de las enzimas se realizó de manera similar que durante el desarrollo, aunque para  $\alpha$ -Galactosidasa y  $\beta$ -Manosidasa se utilizó también una extracción alternativa consistente en un amortiguador de Tris-HCl y NaCl al 0.2M a pH 8.0. La determinación del tiempo idóneo de reacción indicó que para  $\alpha$ -Galactosidasa en dilución 1:10 fue de 15 min y para  $\beta$ -Manosidasa sin dilución fue de 20 min. Los estudios se realizaron en germinado completo y por estructura: testa-endospermo y embrión-plántula, expresándose la actividad en unidades internacionales por semilla o por estructura.

La actividad de  $\alpha$ -Galactosidasa se detectó en la semilla madura deshidratada (0 hrs) para posteriormente presentar un primer máximo a las 12 hrs de imbibición, el cual desciende a las 24 hrs. A partir de este punto aumenta hasta alcanzar un segundo máximo entre las 36 y 48 hrs. Entre las 60 y 72 hrs la actividad disminuye (Fig. 29A).

## RESULTADOS

Los estudios por estructura demostraron que en el endospermo la actividad aumenta a partir de las 24 hrs y obtiene un máximo entre las 36 y 48 hrs. (Fig. 29B). En el embrión-plántula, la actividad de esta enzima aumenta gradualmente hasta estabilizarse entre las 48 y 72 hrs (Fig. 29C), siendo menor la actividad que en el caso de endospermo. Por lo tanto se puede establecer que la actividad de esta enzima se debe principalmente a la presente a nivel de endospermo (Fig. 29D) y que el máximo de actividad coincide con las declinación en la cantidad de GLM. Con respecto a la actividad medida con la extracción a pH 8.0 se encontró que en el germinado completo, el comportamiento y la actividad es similar a la presentada a pH 5.0 (Fig. 30), aunque resalta que a las 12 hrs de imbibición no existe un primer máximo. La actividad presenta en el endospermo y embrión bajo esta extracción no presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) a la medida a pH 5.0 (Fig. 29). Estos resultados coinciden con los presentados por McCleary (1983) al medir esta enzima por los dos métodos de extracción.

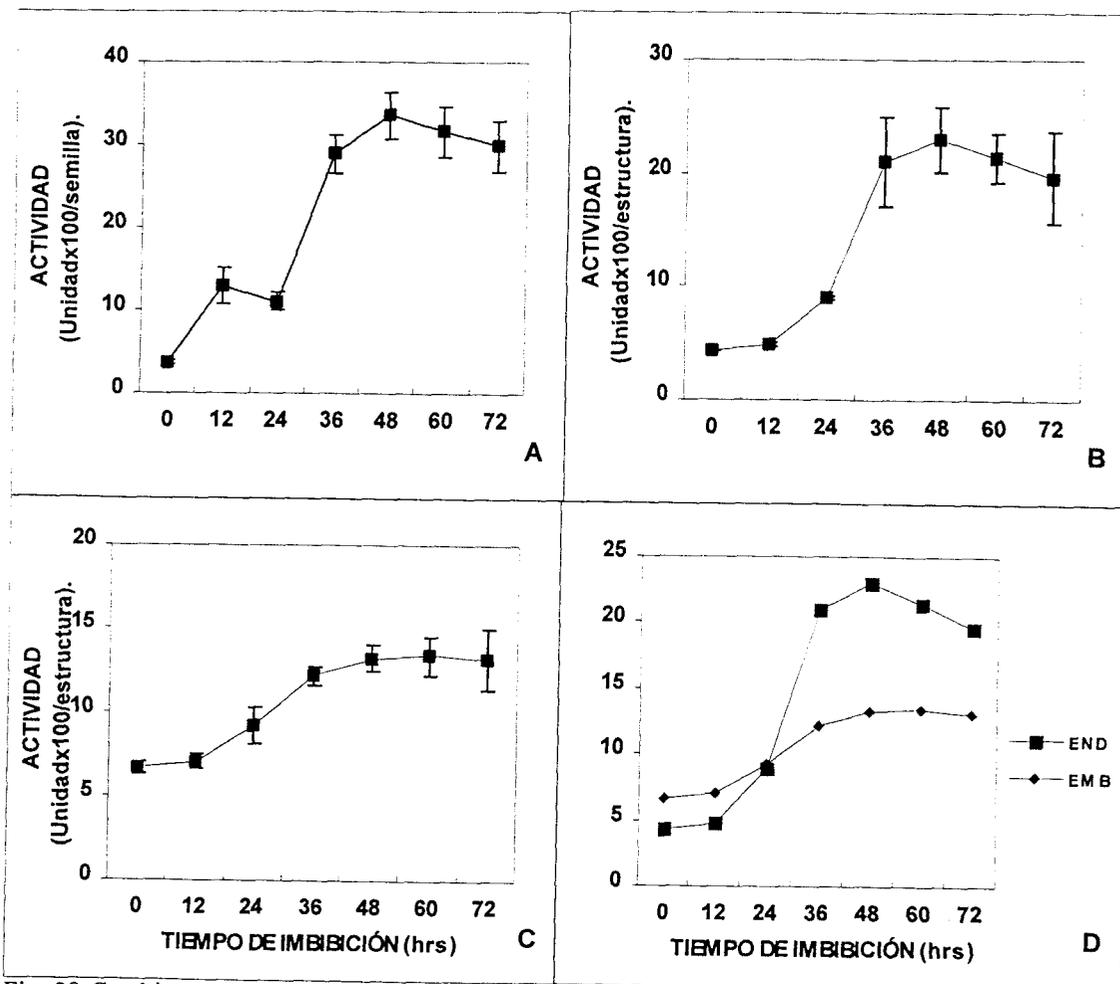


Fig. 29 Cambios en la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa durante la germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*. Los datos representan la media y DS de n=6. A) actividad total, B) en END, C) en EMB y D) comparación entre END y EMB.

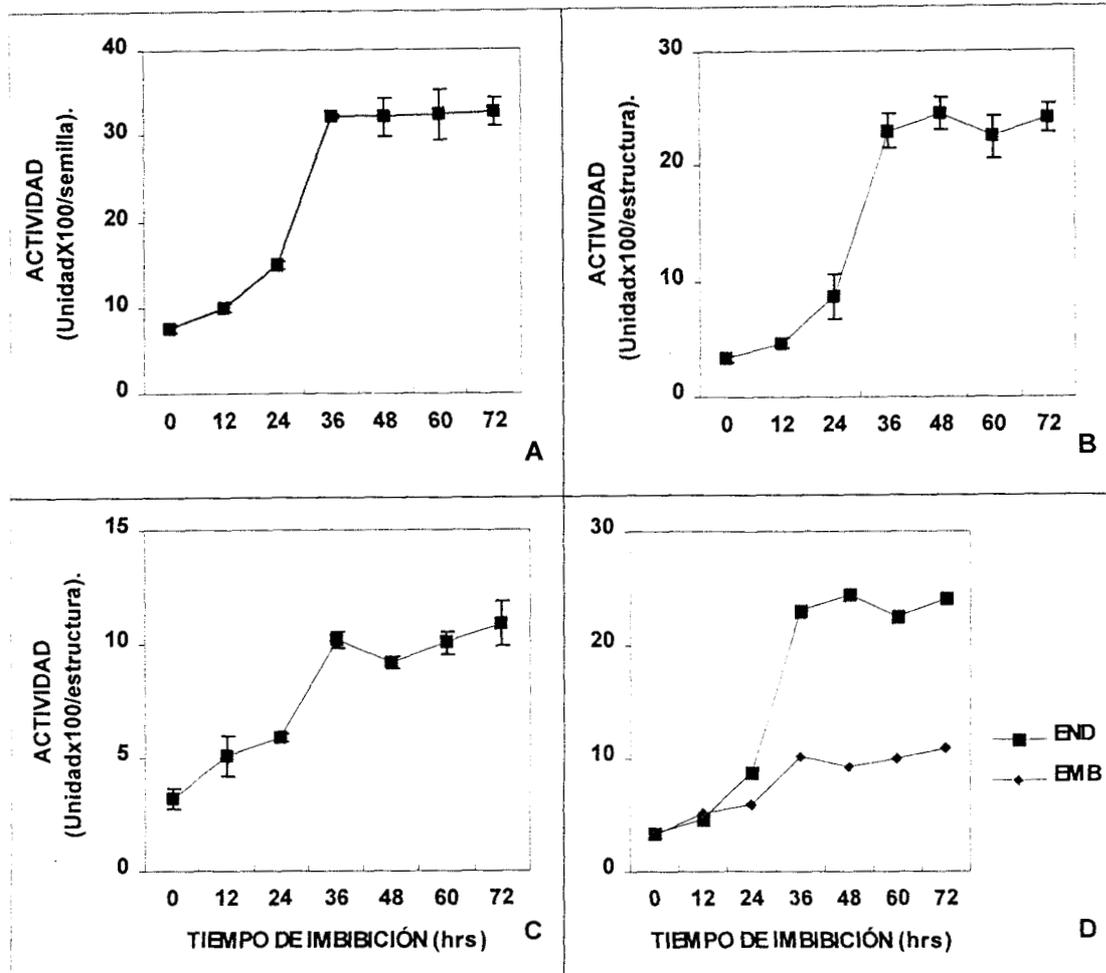


Fig. 30 Cambios en la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa en el embrión extraída a pH 8.0, durante la germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*. Los datos representan la media y DS de n=6. A) actividad total, B) en END, C) en EMB y D) comparación entre END y EMB.

Por otro lado la medición de la actividad de  $\beta$ -Manosidasa permitió observar dos comportamientos distintos debido al proceso de extracción. Inicialmente al medirse la actividad a partir de la extracción con amortiguador de citratos-fosfatos a pH 5.0, se encontró que en el germinado completo la actividad se presenta desde la semilla madura deshidratada y aumenta de manera considerable a partir de las 24 hrs hasta alcanzar un máximo entre las 36 y 48 hrs (Fig. 31A). A nivel de estructura los comportamientos de actividad cambian totalmente. En endospermo la actividad a las 0 hrs de imbibición es mayor que en el germinado completo. Esta actividad se mantiene alta hasta las 24 hrs, a partir de este punto la actividad disminuye sucesivamente (Fig. 31B). La actividad en el embrión-plántula presenta el mismo comportamiento (Fig. 31C), sin embargo en esta estructura la actividad es menor (Fig. 31D). A diferencia de lo encontrado en el germinado completo, el endospermo y embrión-plántula presenta comportamientos opuestos.

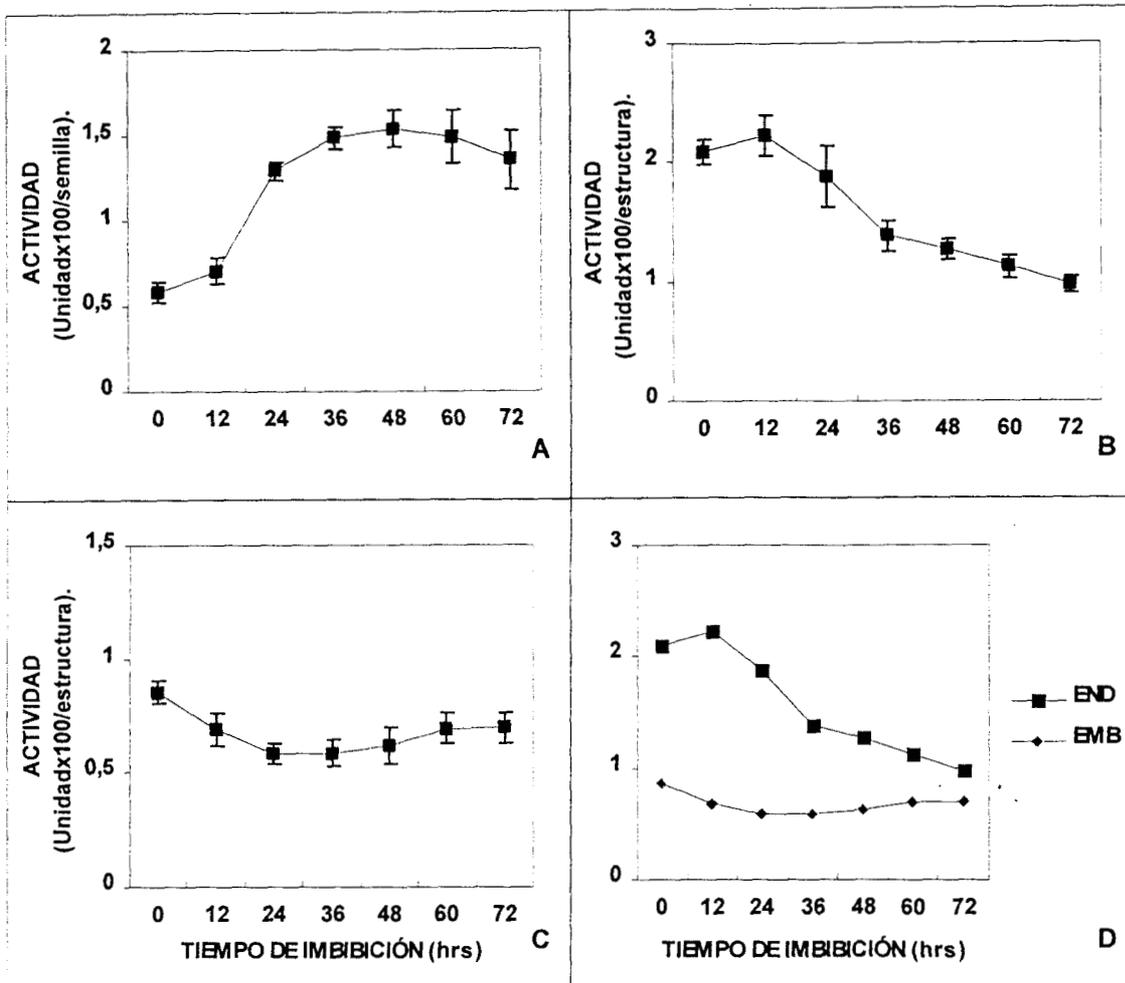


Fig. 31 Cambios en la actividad de  $\beta$ -manosidasa durante la germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*. Los datos representan la media y DS de n=6. A) actividad total, B) en END, C) en EMB y D) comparación entre END y EMB.

Estos resultados obligaron a determinar la causa de tales tendencias, por lo que se propuso cambiar el tipo de extracción. McCleary (1983) y Ouellette y Bewley (1986) ya habían establecido que diferencias en el comportamiento de esta enzima se debía principalmente al proceso de extracción. Considerando ellos que tal enzima se localiza adosada a la pared celular, es necesario utilizar pH alcalinos (pH 8.0) y una alta fuerza iónica (0.2 M de NaCl). Partiendo de lo anterior se extrajo la enzima bajo estas condiciones y se encontró que en el germinado intacto la actividad a las 0 hrs de imbibición es alta y posteriormente disminuye paulatinamente (Fig. 32A). Estructuralmente el endospermo presenta un comportamiento similar al del germinado completo (Fig. 32B) y al presentado en la misma estructura pero con extracción a pH 5.0 (Fig. 31B). El comportamiento en embrión es similar, pero a diferencia de lo encontrado en la extracción a pH 5.0, se encontró que presenta un máximo a las 12 hrs de imbibición para posteriormente disminuir, siendo los valores de actividad similares (Fig. 32C). De esta manera se puede observar que la actividad de  $\beta$ -Manosidasa se localiza principalmente en el endospermo (Fig. 32D).

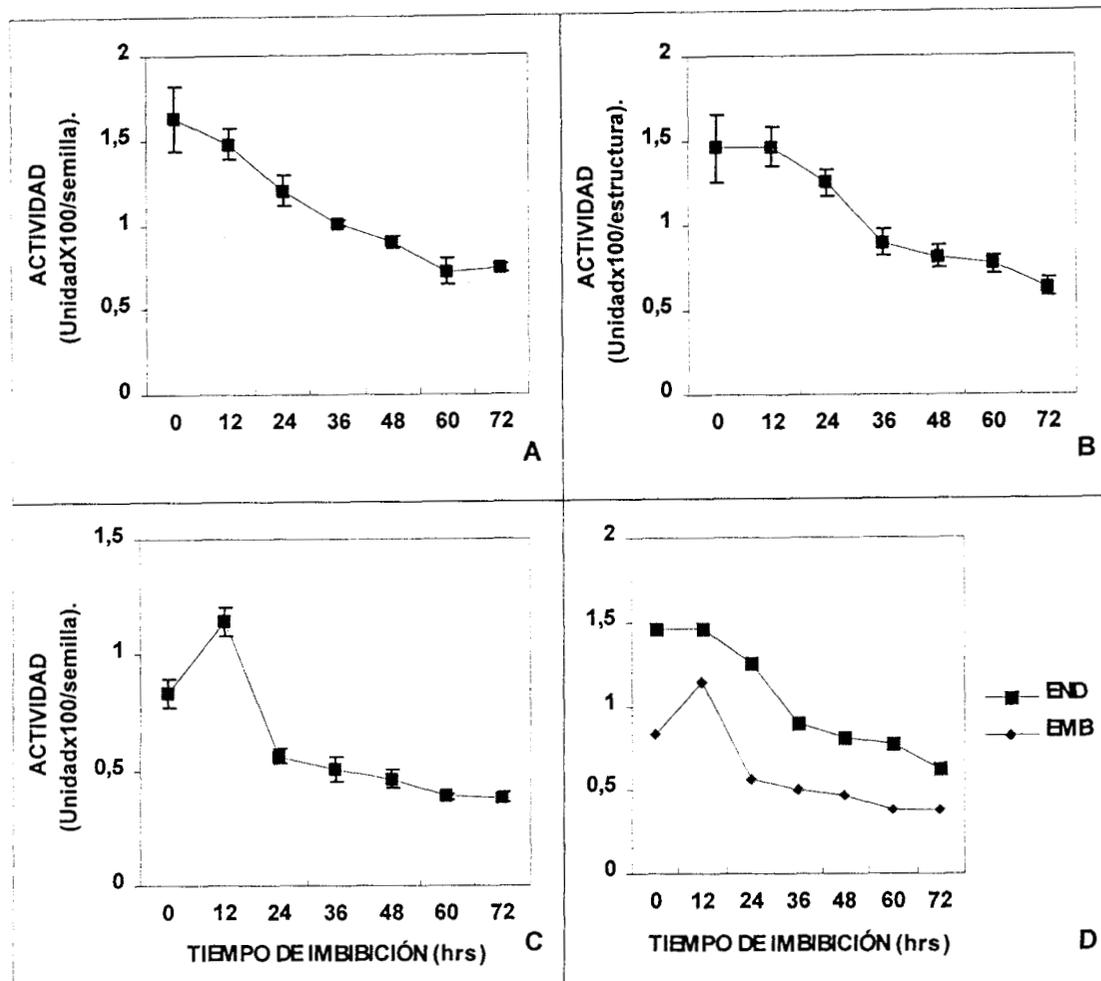


Fig. 32 Cambios en la actividad de  $\beta$ -manosidasa extraída a pH 8.0 durante la germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*. Los datos representan la media y DS de n=6. A) Actividad total, B) en END, C) en EMB y D) comparación entre END y EMB.

**b.-  $\beta$ -Mananasa.**

La actividad de  $\beta$ -Mananasa se detectó de manera significativa durante la germinación y postgerminación. En el germinado completo no se detecta actividad entre las 0 y 12 hrs de imbibición, pero a partir de las 24 hrs inicia un aumento muy importante hasta alcanzar un máximo en las 36 hrs de imbibición. En la última fase de la postgerminación la actividad disminuye paulatinamente (Fig. 33A). Por estructura, la  $\beta$ -Mananasa se encontró en el endospermo presentando la misma tendencia con valores similares al del germinado completo (Fig. 33B). La actividad en el embrión-plántula tiene el mismo comportamiento (Fig. 33C), sin embargo la variación entre ensayos es alta y presenta un orden de magnitud menor que en el caso del endospermo (Fig.33D). La figura 34 muestra los comportamientos comparativos de las actividades de enzimas hidrolíticas durante la germinación y postgerminación.

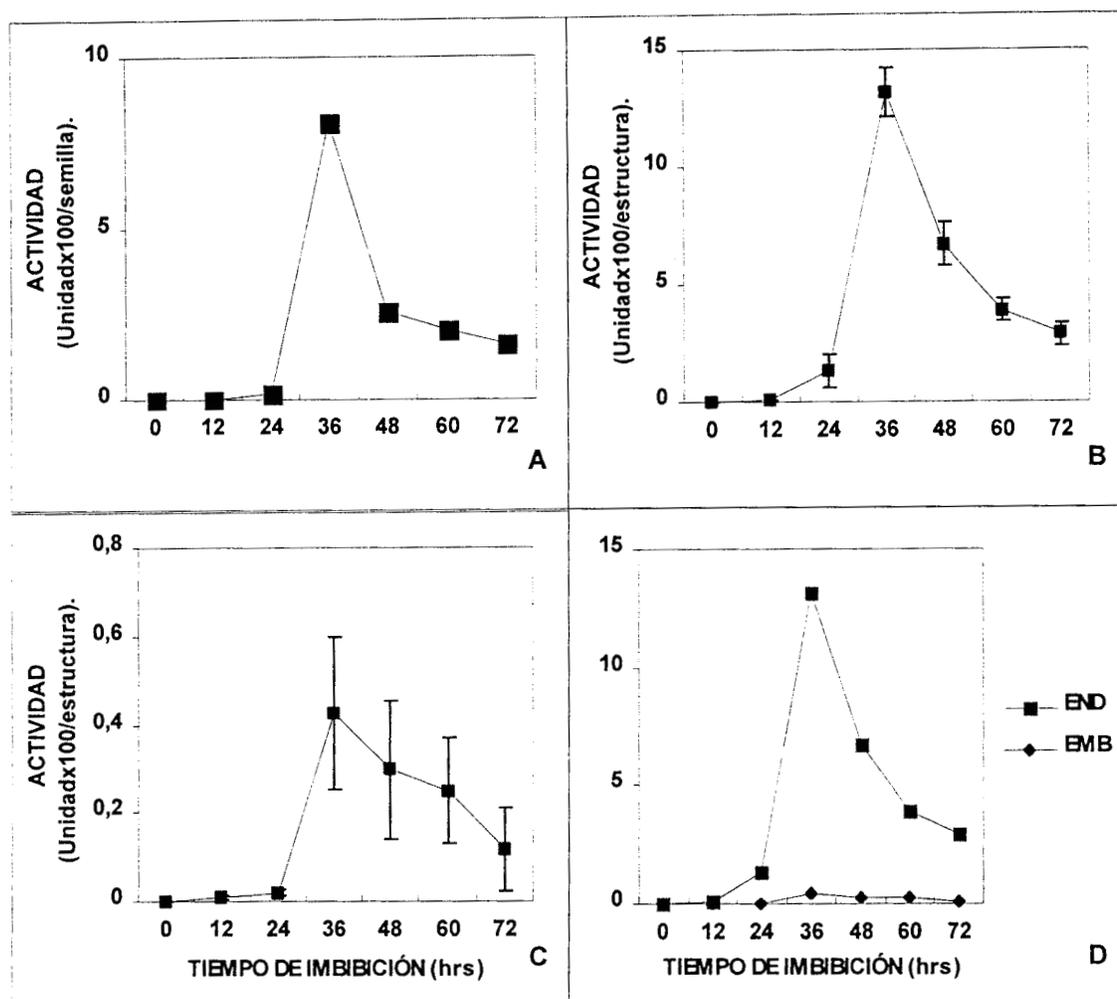


Fig. 33 Cambios en la actividad de  $\beta$ -mananasa durante la germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*. A) Total, B) END, C) EMB y D) comparación entre END y EMB.

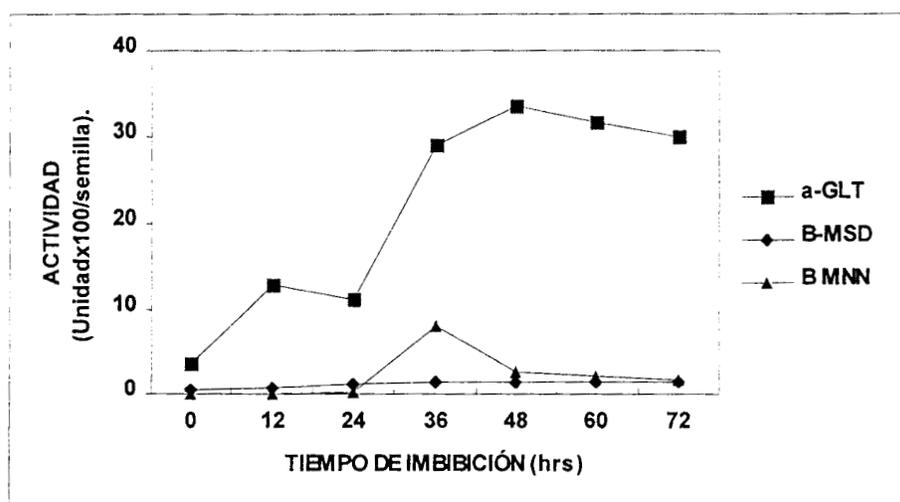


Fig. 34 Cambios en la actividad de enzimas hidrolíticas de GLM durante la germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*. a-GLT =  $\alpha$ -galactosidasa, B-MSD=  $\beta$ -manosidasa y B-MNN=  $\beta$ -mananasa.

222872

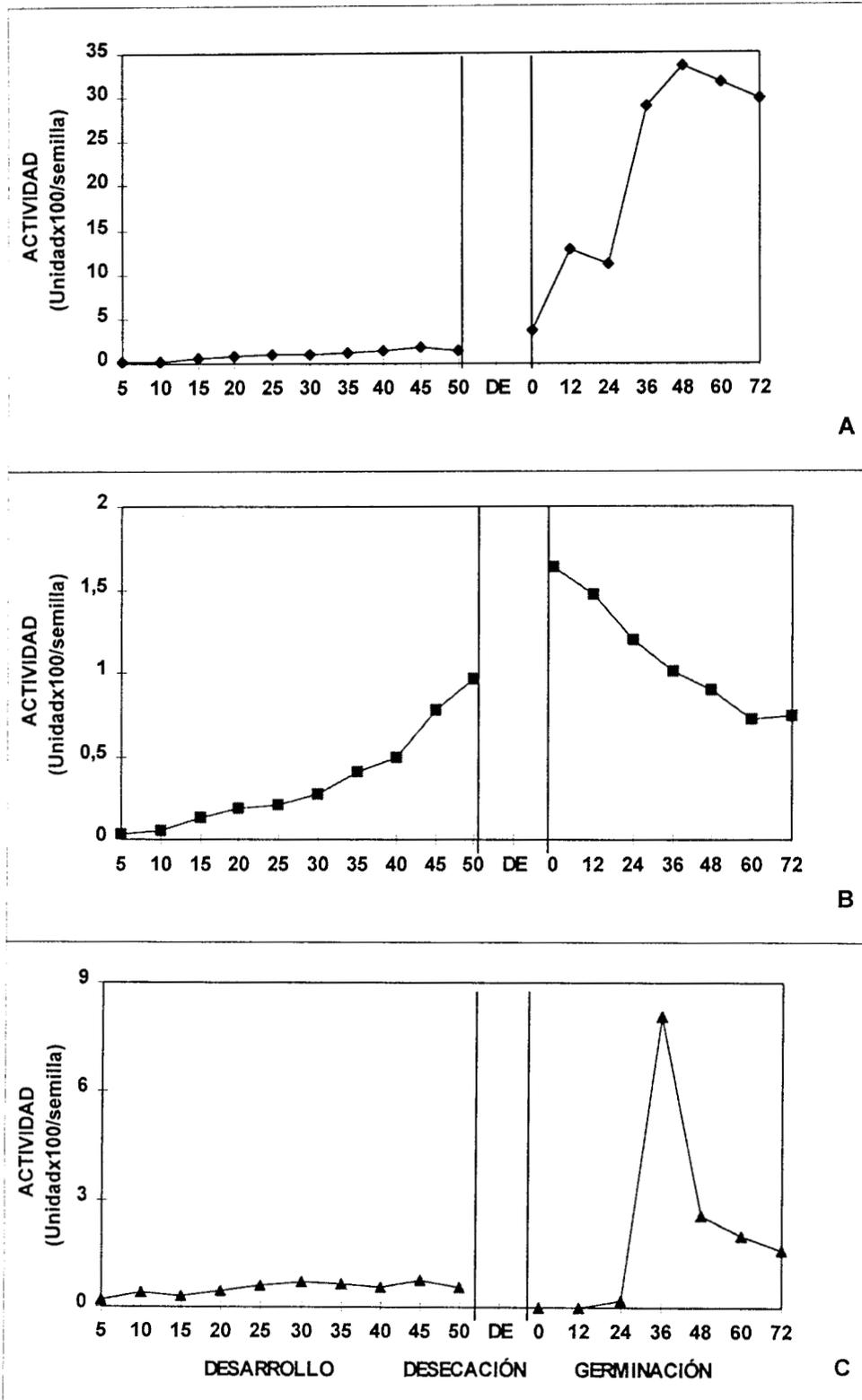


Fig. 35 Cambios en la actividad de las enzimas hidrolíticas de GLM durante el desarrollo, desecación, germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*. Se presenta la media de los datos. A)  $\alpha$ -galactosidasa, B)  $\beta$ -manosidasa y C)  $\beta$ -mananasa.

c.- Actividad Amilolítica.

La actividad amilolítica soluble se midió con base en la metodología propuesta por Díaz-Pontones (1992) en la cual se realiza una extracción con un amortiguador de acetatos pH 6.0 y 4.8 para posteriormente medir la actividad en el extracto crudo y la actividad en la fracción termoestable al someterse a 70°C durante 20 min. De la resta de la actividad total y de la fracción termoestable, podemos obtener la actividad mayoritaria de  $\beta$ -amilasa. La fracción termoestable representa mayoritariamente la actividad de  $\alpha$ -amilasa. De igual forma se midió la actividad amilolítica total a pH 5.6 de acuerdo a Bewley y colaboradores (1993). La actividad se expresó en almidón consumido/minuto/estructura.

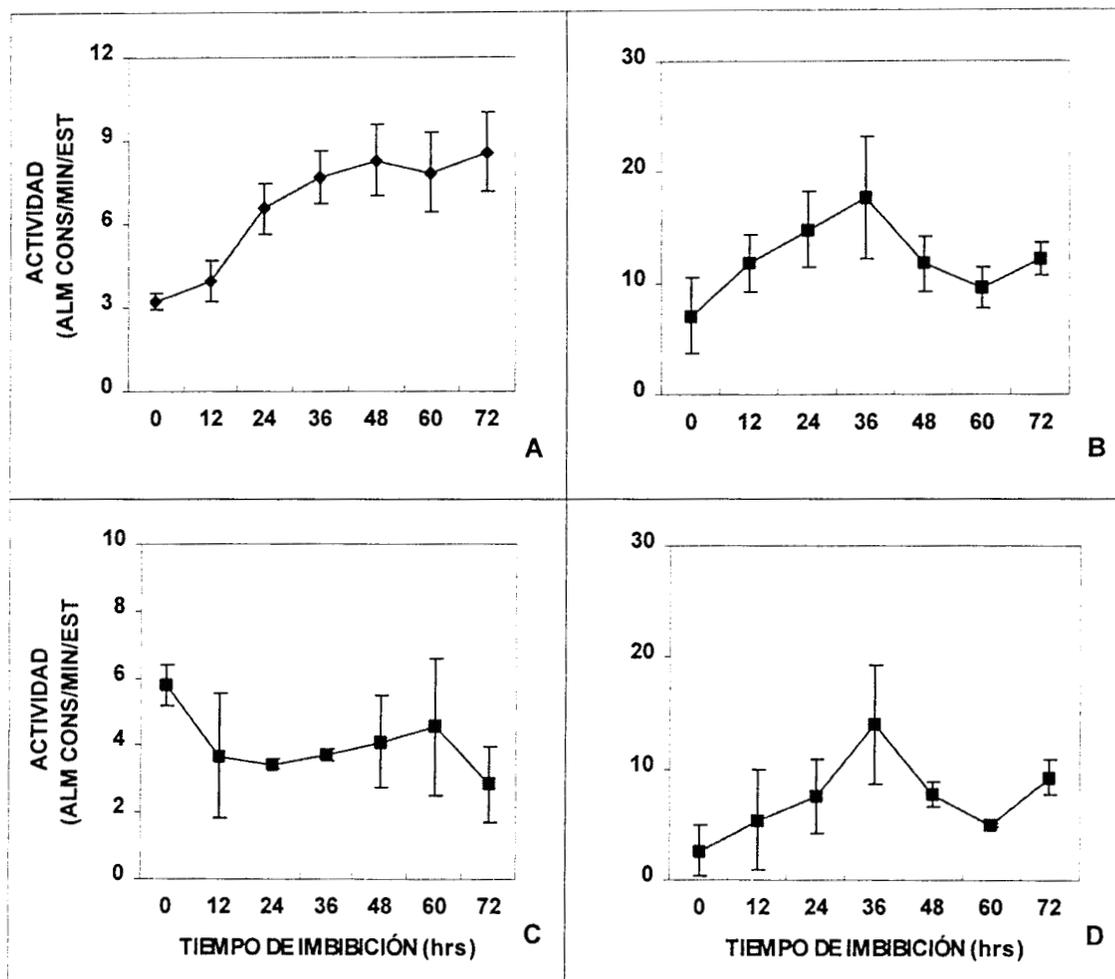


Fig. 36 Cambios en la actividad total de amilasa soluble del embrión durante la germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*. Los datos representan la media y DS de n=4. A) actividad total a pH 5.6, B) actividad total a pH 4.8, C)  $\alpha$ -amilasa a pH 4.8 y D)  $\beta$ -amilasa a pH 4.8.

La actividad amilolítica se localizó únicamente a nivel del embrión plántula durante la germinación y postgerminación. No se detectó actividad a pH 6.0, sin embargo se detectó actividad a pH 4.8 y 5.6. La actividad amilolítica total soluble a pH 5.6 se detecta desde la semilla madura deshidratada y aumenta gradualmente hasta obtener un máximo entre las 60 y 72 hrs (Fig. 36A). A pH 4.8 la actividad total presenta un máximo a las 36 hrs de imbibición, a partir del cual disminuye hasta las 60 hrs (Fig. 36B). Se presenta un segundo máximo hacia las 72 hrs. La actividad de  $\beta$ -amilasa presenta el mismo comportamiento (Fig. 36C). La  $\alpha$ -amilasa medida a pH 4.8 presenta un comportamiento distinto (Fig. 36D), a las 0 hrs, la actividad es alta para después mantenerse constante hasta las 36 hrs, presentando un máximo hacia las 60 hrs de imbibición.

VII.- Discusión.

- A.- Desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*
- B.- Carbohidratos durante el desarrollo de la semilla.
- C.- Carbohidratos durante la germinación y postgerminación.
- D.- Enzimas hidrolíticas durante el desarrollo.
- E.- Enzimas hidrolíticas durante la germinación y postgerminación
- F.- Actividad amilolítica durante la germinación y postgerminación.
- G.- Modelo de movilización de carbono en *Ipomoea purpurea*.

### A.- Desarrollo de la Semilla de *Ipomoea purpurea*.

El desarrollo de la semilla ocurre en un lapso de 29 -31 días desde la antesis hasta la semilla madura hidratada. Se presentan dos fases principales, una de alta división celular seguida de una fase de aumento en el peso fresco y acumulación de sustancias de reserva. En estas etapas las diferentes estructuras que componen a la semilla sufren una serie de modificaciones; se ha demostrado en *I. purpurea* que la morfogénesis de la cubierta seminal comienza en el momento de la fertilización, reconociendo cuatro capas de células a los 5 días: la capa más externa o epidermis, la hipodermis, la tercera capa derivada de la hipodermis con células esclerenquimatosas y la cuarta capa que consiste de estratos de células parenquimatosas. Las células parenquimatosas acumulan grandes cantidades de almidón entre los 20 y 25 mg de peso fresco, los cuales son degradados en etapas posteriores (Díaz-Pontones *et al.*, 1992). A la mitad del desarrollo la epidermis, la hipodermis y la capa en empalizada engrosa sus paredes celulares. La hipodermis además se impregna con lignina y un alto contenido de compuestos fenólicos (López-Curto *et al.*, 1990; Ponce-Salazar *et al.*, 1993). También se ha demostrado que durante el desarrollo del embrión se observa una etapa globular a los 5 días de desarrollo (5-10 mg), un embrión de tipo corazón a los 10 días que posteriormente se desarrolla en un embrión de tipo torpedo con cotiledones alargados (15 días postantesis) y culminar con un embrión cotiledonal a los 23 días de iniciado el desarrollo, con presencia de laticíferos. Se observa en la semilla madura hidratada que los cotiledones presentan la forma de hoja doble plegada y ocupan un gran volumen dentro de la semilla (Díaz-Pontones *et al.*, 1992).

El endospermo durante las primeras etapas del desarrollo es de tipo nuclear en donde los núcleos de la células son formados por divisiones nucleares libres y no es hasta que el embrión adquiere la forma de torpedo temprano, es decir a los 13-15 días postantesis, cuando se inicia la celularización por la región micropilar. Las células endospermicas en un principio tienen paredes celulares delgadas, además de ser vacuoladas, posteriormente, el endospermo consiste de zonas periféricas de células pequeñas rectangulares que desarrollan progresivamente paredes más gruesas. La mayor parte del endospermo llega a ser celular a los 17 días postantesis (Díaz-Pontones *et al.*, 1996).

### B.- Carbohidratos Durante el Desarrollo de la Semilla.

En semillas en desarrollo, el embrión asimila los nutrimentos por parte de la planta madre a través del floema y de éste hacia las diferentes partes de la semilla. Sistemas de transporte activo (McDonald *et al.*, 1996) y pasivos (Dejon *et al.*, 1996) están localizados en diferentes partes de la semilla y éstos pueden representar puntos de control en el proceso.

Las semillas importan sacarosa (Sac), la cual puede ser hidrolizada por medio de la invertasa antes de entrar al metabolismo o a la síntesis de productos de almacenamiento (Quick *et al.*, 1996). Para el caso de las leguminosas como *V. faba*, la hidrólisis de Sac puede darse a nivel de la cubierta seminal, permitiendo que las concentraciones de hexosas en los cotiledones se eleven en las primeras fases de desarrollo (fase de pre-almacenamiento), por lo que no se acumula Sac en estas estructuras (Weber *et al.*, 1996a). Según la hipótesis del control de la invertasa durante el desarrollo de la semilla y en la fase de almacenamiento, la actividad de esta enzima disminuye y la cantidad de Sac aumenta en los tejidos permitiendo la síntesis de productos de acumulación (Weber *et al.*, 1997). En este estudio se encontró que durante las primeras fases de desarrollo (hasta los 30 mg) no se acumula Sac en la semilla *Ipomoea purpurea*, sin embargo hacia el final del desarrollo la testa, el endospermo y el embrión acumulan este disacárido (Fig. 8), datos que coinciden con la literatura.

Por otro lado, las hexosas medidas: Glu, Fru y Gal presentan comportamientos distintos. Estudios realizados en *I. purpurea* indican que en las primeras fases de desarrollo se degrada el almidón (Alm) de la cubierta seminal (Díaz-Pontones *et al.*, 1992). La glucosa se acumula hacia la mitad del desarrollo en la testa (Fig. 4), la cual con base en la hipótesis de la invertasa se originaría de la Sac en las primeras fases del desarrollo y serviría para la síntesis de Alm en la cubierta seminal, el cual a su vez se degrada hacia la mitad del desarrollo y libera este azúcar. Los cambios en las proporciones Glu/Fru apoyan este hecho (Fig. 37A y B), ya que al inicio del desarrollo la proporción se mantiene cercana a uno (lo cual indica que ambas hexosas provienen de Sac), pero posteriormente incrementa justo cuando se da la hidrólisis de almidón en la cubierta seminal, indicando que éste incremento en la cantidad de Glu proviene de este polímero. En etapas posteriores la proporción nuevamente se acerca a uno. Por estructura estas proporciones son cercanas a uno en embrión y endospermo, pero en testa existe un aumento en las etapas intermedias y posteriormente disminuye a uno. Se ha establecido en otros modelos que este carbohidrato se acumula en el endospermo dependiendo de la existencia y del tipo de traslocador (Dejon *et al.*, 1996). Según las proporciones Glu/Fru, la Glu acumulada en el endospermo puede deberse a la hidrólisis de Sac a nivel de la testa. De manera paralela la fructosa (Fru) presenta el mismo comportamiento a nivel de las estructuras de la semilla, sin embargo en la semilla íntegra se mantiene constante (Fig. 5), lo que indica que en testa la Fru proviene únicamente de la hidrólisis de Sac. La concentración de ambas hexosas en el embrión durante las últimas fases de desarrollo son bajas al igual que en *V. faba* (Barratt y Pullent, 1984; Weber *et al.*, 1996b), debido que en esta etapa se encuentra la fase de almacenamiento de Sac. Es importante señalar que los patrones de acumulación de hexosas y Sac están íntimamente relacionados con el estado de desarrollo morfológico de *I. purpurea*, ya que en las primeras etapas de desarrollo cuando se acumulan estas hexosas se da la diferenciación del embrión (desde globular hasta cotiledonal) y del endospermo (de la fase nuclear a celular), y durante las etapas finales se acumula Sac en las tres estructuras, las cuales inician un periodo de almacenamiento, coincidiendo con el papel propuesto para las hexosas en el crecimiento y división celular y la función de Sac en la síntesis de productos de almacenamiento (Weber *et al.*, 1997).

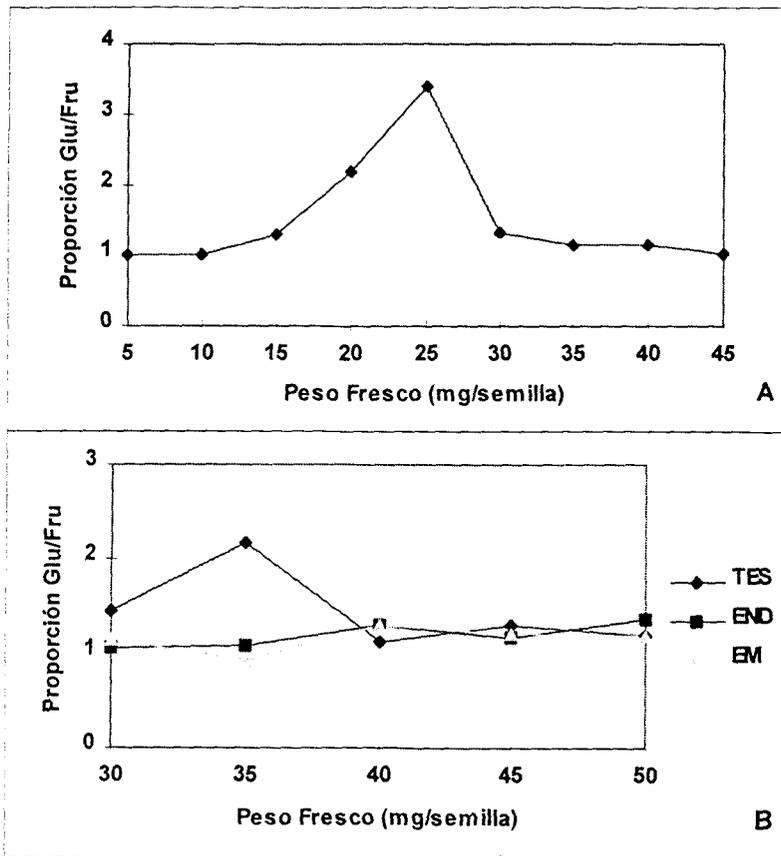


Fig. 37 Cambios en las proporciones glucosa/fructosa durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. A) Semilla completa y B) Estructura. Las proporciones se obtuvieron con la media de los datos obtenidos para cada carbohidrato.

Durante la fase de almacenamiento las semillas pueden acumular almidón, proteínas y lípidos. En el caso de leguminosas endospermicas y algunas semillas de las familias Convolvulaceae, Ebanaceae, Annonaceae, Caesalpineae, Mimosaceae, entre otras, el mayor producto de almacenamiento es depositado en las paredes celulares del endospermo en forma de un polisacárido denominado galactomanano (Meier y Reid, 1982). En *I. purpurea* se encontró que este polisacárido se acumula únicamente en el endospermo a partir de la mitad del desarrollo, obteniendo el valor máximo en la etapa de semilla madura hidratada (Fig. 9), este polisacárido debe ser considerado como galactomanano, ya que la cromatografía y las pruebas químicas demostraron la presencia de manosa y galactosa únicamente (Tabla 1). Estos datos coincide con los estudios realizados en *Trigonella foenum-graecum* (Reid y Meier, 1970) *Gleditsia triacanthos* (Mallet *et al.*, 1987), *Cyamopsis tetragonoloba* y *Senna occidentalis* (Edwards *et al.*, 1992). Se observa al mismo tiempo que el inicio en la acumulación del GLM coincide con la celularización del endospermo y el incremento en el peso fresco de la semilla, siendo similar a lo encontrado por Campbell y Reid (1978) y Edwards *et al.* (1992). Con los resultados obtenidos en esta investigación se propone que la aparición y la acumulación de GLM pueden ser utilizados como un marcador del desarrollo del endospermo en la semilla de *I. purpurea* (ver índices

de correlación en tabla 2). La determinación de GLM realizado por dos métodos indica que la síntesis de este polisacárido está altamente coordinada con el metabolismo Gal en el endospermo. Esto puede apreciarse al analizar que los patrones de acumulación presentan la misma tendencia, lo que apoya la propuesta de una síntesis de GLM coordinada entre la galactosil-transferasa y manosil-transferasa (McCleary y Matheson, 1986; Reid *et al.*, 1985). De esta forma la acumulación de GLM está relacionada con el decremento en la cantidad de almidón a nivel de cubierta seminal y Gal en el endospermo, así como con el aumento en las pozas de Sac y en menor proporción de Glu y Fru en endospermo (Fig. 4, 5, 7 y 8). Es posible por lo tanto que estos carbohidratos sean las fuentes de carbono disponibles para la síntesis de éste polisacárido. A diferencia de lo reportado por Reid y Meier para semillas de *Trigonella foenum-graecum* (1970), no se encontraron cantidades apreciables de  $\alpha$ -galactosil oligosacáridos (serie de la Rafinosa) en la fase final de acumulación de GLM. La cantidad de galactosa en el endospermo declina al final del desarrollo debido a que en esas etapas se da la síntesis de GLM (Fig. 8-11). La detección de un nRaf en la misma estructura puede ser el resultado de la extracción, debido a que las cadenas pequeñas de este polímero son exportadas a la pared celular durante este periodo (Meier y Reid, 1977) o bien a concentraciones bajas de éste acumuladas en la capa de aleurona.

Se ha demostrado en especies de leguminosas que la presencia de  $\alpha$ -galactosil oligosacárido (serie de la rafinosa) tiene importancia fisiológica durante los procesos de estrés a frío y tolerancia a la desecación debido a que están involucrados en la protección celular (Koster y Leopold, 1988; Kuo *et al.*, 1988, Lowell y Kuo, 1989). Según la hipótesis del reemplazamiento, los sacáridos ocupan los sitios de hidratación de los componentes celulares, permitiendo la formación del estado vítreo (Koster, 1991; Blackman *et al.*, 1992). La presencia de cantidades mínimas de  $\alpha$ -galactosil oligosacárido durante el desarrollo de *I. purpurea* indicar que probablemente no se alcanzó el periodo donde se da la síntesis de este nRaf (Fig. 6). Sin embargo en la semilla madura deshidratada se cuantificaron cantidades elevadas de nRaf y se determinó que se trata de verbascosa. La síntesis de este oligosacárido está íntimamente relacionado con la desaparición de Sac, Glu y Fru durante el proceso de desecación (Fig. 10 y 22). La cantidad de  $\mu$ moles de Sac, Glu y Fru (0.22, 0.24 y 0.138  $\mu$ moles respectivamente) que desaparecen en esta etapa coinciden con la cantidad de  $\mu$ moles que aparecen de nRaf (1.15  $\mu$ moles). Esto indica que la síntesis del nRaf se da a partir de la Sac presente en la semilla madura hidratada y la Gal utilizada para este fin proviene de las pozas de Glu y Fru existentes al final del desarrollo (Fig. 22). Es imperativo por lo tanto realizar estudios en la fase de desecación para conocer el momento exacto de la síntesis de nRaf y la función de estos en la adquisición de la tolerancia a la desecación.

### C.- Carbohidratos Durante la Germinación y Postgerminación.

Durante la imbibición de la semilla se pueden observar tres fases: germinación (0-24 hrs), postgerminación temprana (24-48 hrs) y postgerminación tardía (48-72 hrs). La emergencia de la radícula se da hacia las 24 horas de imbibición. A partir de este punto, la

longitud de la radícula, así como el peso fresco aumentan gradualmente como sucede con otras Convolvulaceae (Crowley y Buchannan, 1980) y coincide con los estudios realizados en la misma semilla (Brechu-Franco, 1994). El peso seco se mantiene constante durante las tres fases, lo que indica que la semilla en condiciones etioladas únicamente está transformando compuestos sin pérdida significativa en el peso seco (Fig. 11-13).

Durante la fase de germinación se consumen la verbascosa (nRaf) localizada a nivel del embrión, lo cual coincide con lo demostrado en otras semillas endospermicas (McCleary y Matheson, 1974; Murray, 1984; Bewley y Black, 1985), la presencia de estos oligosacáridos indica que funcionan como substratos del metabolismo respiratorio en el proceso de germinación (Fig. 14). La cantidad mínima de galactosa encontrada demuestra que esta no se acumula en forma considerable y tal vez sea utilizada rápidamente en el metabolismo respiratorio o en la síntesis de pared celular como se ha propuesto en otras semillas (Reid y Meier, 1972; Dey, 1978).

Durante la fase de germinación los niveles de GLM en endospermo de *I. purpurea* permanecen constantes, posteriormente las cantidades de GLM comienzan a disminuir en la postgerminación temprana y hacia la postgerminación tardía desaparece totalmente. Estas etapas de degradación de GLM son similares a las reportadas en *Turbina corymbosa* desde la perspectiva histológica (Brechu-Franco, 1980; Brechu-Franco *et al.*, 1984). Sin embargo, durante la germinación la galactosa que constituye el esqueleto del GLM desaparece 12 horas antes (Fig. 15 y 21). Probablemente esto se deba a la acción de  $\alpha$ -galactosidasa que durante estas etapas aumenta considerablemente (Fig. 29). Esto muestra una diferencia en este proceso que no había sido reportado con anterioridad.

La secuencia de movilización de reservas de GLM en *I. purpurea* (Fig. 28) indica que al ser degradado el GLM en el endospermo, los esqueletos de carbono provenientes de éste son absorbidos por los cotiledones para dar lugar al aumento en la concentración de Sac y la acumulación de Alm. Estos últimos son transitorios, ya que en la postgerminación tardía son degradados en el embrión-plántula para dar lugar al aumento de las pozas de Glu y Fru (Fig. 17-21). Es probable por lo tanto, que la sacarosa sea traslocada al eje y ahí sea hidrolizada para dar origen a Glu y Fru (Halmer *et al.*, 1978) donde se acumulan en forma considerable (ver índices de correlación Tabla 2). Este esquema de degradación es similar a lo que sucede en otras semillas endospermicas como las leguminosas (Reid, 1971; McCleary y Matheson, 1974; Dea y Morrison, 1975; Dea, 1978; Meir y Reid, 1982; McCleary, 1983; Bewley *et al.*, 1993; Bewley y Black, 1985).

Se conoce que la cantidad de galactomanano en las semillas de Convolvulaceae pueden ser consideradas como de contenido medio (10 a 15% del peso seco) (Tookey *et al.*, 1962), encontrándose que *I. purpurea* contiene uno de los valores más altos de esta categoría, superior al 20% del peso seco (datos no mostrados). En este sentido, al comparar los % de galactomanano con especies de las familias Fabacea, Mimosaceae, Caesalpiniaee permiten proponer a *Ipomoea purpurea* (planta nativa en México y ampliamente distribuida) como una fuente alterna de obtención del polisacárido, dado que actualmente no tiene uso alguno en el país. Cabe señalar que la industria de alimentos en México importa grandes cantidades de estos polisacáridos y muy poco se sabe acerca del potencial de especies mexicanas que pueden reemplazar a las especies productoras del extranjero.

PARAMETROS	CORRELACION	VALOR-P
mg-pf, GLM	0,949	< 0,0001
lmb, GLM	-0,909	< 0,005
lmb, Glu	0,961	< 0,0001
lmb, Fru	0,971	< 0,0001
GLM, Alm	-0,985	< 0,001
GLM, Sac	-0,941	< 0,05
Alm, Sac	0,992	< 0,01
nRaf, Alm	-0,871	< 0,01
nRaf, Sac	-0,952	< 0,01
GLM, Glu	-0,868	< 0,01
GLM, Fru	-0,91	< 0,005
Glu, Fru	0,994	< 0,0001

Tabla 2 Análisis de correlación entre las pozas de carbohidratos durante el desarrollo, germinación y postgerminación de *Ipomoea purpurea*. Los valores de P son menores a 0.05. Abreviaciones igual que en figuras.

#### D.- Enzimas Hidrolíticas durante el Desarrollo.

Entre las plantas, la enzima  $\alpha$ -galactosidasa ha sido detectada ampliamente; se ha encontrado dentro de las leguminosas y otras especies que contienen sustratos  $\alpha$ -D-galactosídicos. Actualmente está bien establecido que en plantas una de las funciones de la  $\alpha$ -galactosidasa es romper los grupos  $\alpha$ -D-galactosil de oligo y polisacáridos que contienen  $\alpha$ -D-galactosa. Los productos de degradación entonces formados funcionan como un fuente de energía y de metabolitos celulares (Dey, 1978).

Durante el desarrollo de *Ipomoea purpurea* se demostró la presencia de actividad de  $\alpha$ -Galactosidasa, detectándose desde la anthesis hasta obtener un máximo a los 45 mg-pf en la semilla completa (Fig. 23), similar a lo establecido en estudios realizados durante el desarrollo de *Trigonella foenum-graecum*, *Cyamopsis tetragonoloba* y *Senna occidentalis* (Edwards *et al.*, 1992).

En el endospermo de *Ipomoea purpurea* ésta enzima aumenta gradualmente hasta alcanzar un máximo en la semilla madura deshidratada, sin embargo los niveles de actividad son bajos al compararse con las otras dos estructuras: embrión y testa (Fig. 23). Estos datos contrastan con los obtenidos para *T. foenum-graecum* y *C. tetragonoloba* donde los niveles de  $\alpha$ -galactosidasa en el endospermo son constantes y bajan justamente durante la depositación de GLM. Sin embargo, son similares a los reportados en *S. occidentalis*, en la cual existe un incremento considerable en la actividad de esta enzima en la etapa de depositación tardía de GLM (Edwards *et al.*, 1992).

Se ha establecido anteriormente una relación directa entre la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa del endospermo y los cambios en la proporción manosa/galactosa que se producen después de la síntesis de GLM. Para el caso de algunas leguminosa como *T. foenum-graecum* (Reid y Meier, 1970) y *C. tetragonoloba* (Edwards *et al.*, 1992), no existen evidencias de modificación post-síntesis en estas proporciones. Sin embargo en leguminosas primitivas como *S. occidentalis* se ha reconocido una correspondencia exacta entre los cambios en las proporciones manosa/galactosa en el GLM y los niveles de  $\alpha$ -galactosidasa del endospermo, lo cual permitió concluir que esta enzima media las modificaciones post-síntesis de GLM (Edwards *et al.*, 1992). Así mismo Mallett y colaboradores (1987) en *Gleditsia triacanthos* han reportado una disminución en la proporciones manosa/galactosa y la presencia de actividad de  $\alpha$ -galactosidasa en las semillas maduras, sin embargo ellos postulan la posibilidad de que las modificaciones en estas proporciones se deban a los efectos estéricos y conformacionales en el complejo membranal de biosíntesis de GLM, donde están involucradas la manosil y galactosil transferasa (McCleary y Matheson, 1986), y no a la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa. Por lo tanto la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa en *I. purpurea* puede estar involucrada en las modificaciones de las proporciones manosa/galactosa durante la acumulación de GLM.

Edwards *et al* (1992) establecieron la probabilidad de que las modificaciones en las proporciones manosa/galactosa no ocurran en todas las leguminosas endospermicas. De tal forma que la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa se presentaría solo en las leguminosa primitivas o en aquellas semillas con bajos contenidos de galactosa en el GLM. Pruebas preliminares en las proporciones manosa/galactosa de *Ipomoea purpurea* indican que ésta presenta niveles bajos de galactosa en el GLM, tal vez debido a las modificaciones post-síntesis derivadas de la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa. Por lo tanto y de acuerdo al criterio taxonómico de proporciones y de modificación de manosa/galactosa (Bailey, 1971; Dea y Morrison, 1975; Reid, 1985; Buckeridge *et al.*, 1995), es probable que semillas del género *Ipomoea* pertenecientes a la familia Convolvulaceae puedan ser consideradas dentro del grupo de las endospermicas primitivas.

La presencia de  $\alpha$ -galactosidasa a nivel del embrión en *Ipomoea purpurea* (Fig. 23), se encuentra vinculada con la degradación de los azúcares de la serie de la rafinosa durante el proceso de germinación, como en el caso de las semillas *T. foenum-graecum*, en donde los niveles de  $\alpha$ -Galactosidasa en el embrión son altos en la semilla madura deshidratada (Reid y Meier, 1973). Es probable que esta enzima se encuentre compartamentalizada como en el caso de *Vicia faba*, ya que su actividad se presenta durante las primera horas de imbibición y en este periodo se degradan los nRaf (Fig.14).

Es probable que en testa la actividad basal de  $\alpha$ -Galactosidasa pueda tener funciones distintas a las propuestas para el endospermo y el embrión (Fig. 30 y 33). No ha sido reportada la actividad de esta enzima en esta estructura, sin embargo histoquímicamente se ha demostrado en *I. purpurea* que en estas etapas se acumulan en el esclerénquima en empalizada cantidades considerables de lignina, así como lípidos, taninos y cutina (Ponce-Salazar *et al.*, 1990). Es importante mencionar que las células del parénquima continúan degradando sus reservas de almidón y es probable que esta enzima

esté involucrada en estos procesos. Quedará por establecer la función y participación de la  $\alpha$ -Galactosidasa en esta estructura.

Similar al caso de  $\alpha$ -galactosidasa se ha demostrado también la actividad de  $\beta$ -manosidasa durante el desarrollo de semillas endospermicas (Reid y Meier, 1972; McCleary y Matheson, 1975). En *I. purpurea* los niveles de  $\beta$ -manosidasa aumentan gradualmente hasta alcanzar un máximo en la semilla madura hidratada y se encuentran principalmente en el endospermo y el embrión (Fig. 25). En *C. tetragonoloba* se ha determinado que esta enzima se acumula durante el desarrollo del endospermo, sin embargo en semillas como *T. foenum-graecum* y *S. occidentalis* se presenta solo en niveles bajos (Edwards *et al.*, 1992). Es probable por lo tanto que la actividad de la enzima localizada en el endospermo y embrión cumplan funciones en la movilización de GLM durante la germinación y postgerminación y únicamente sean almacenadas durante el desarrollo de *I. purpurea*. Se sabe que esta enzima es inactiva sobre el GLM intacto (McCleary, 1983) pero, tiene un rol en el metabolismo postgerminativo (Reid y Meier, 1973). Edwards *et al* (1992) han establecido que las diferencias en la regulación de los niveles de actividad de  $\beta$ -manosidasa son de carácter inter-especies, lo cual se confirma con los datos obtenidos para *I. purpurea*.

La presencia de  $\beta$ -mananasa en semillas que contienen reservas de GLM ha sido ampliamente demostrada (McCleary y Matheson, 1975). Esta enzima cataliza la hidrólisis de enlaces  $\beta$ -D-(1-4)-manósidos en GLM, mananos y glucomananos entre otros (Dey, 1978). Se ha reportado que esta enzima se puede localizar tanto en las semillas maduras deshidratadas como en proceso de imbibición. En el primer caso se han localizado principalmente en dicotiledóneas como *Lactuca sativa* y gimnospermas como *Pinus banksiana* (Dirk *et al.*, 1995), en ambos casos a nivel del embrión. Sin embargo, en *I. purpurea* se encontró que la actividad endo- $\beta$ -mananasa se localiza única y exclusivamente en la testa y su actividad se incrementa hacia el final del desarrollo (Fig. 27). Los niveles de actividad son menores que en el caso de la actividad presente durante la postgerminación (Fig. 33). Debido a que esta actividad es solo medible cuando se utiliza como sustrato GLM de semillas deshidratadas, es probable que su acción no sea sobre el GLM que se está sintetizando. Dirk *et al* (1995) han comprobado la presencia de esta enzima en tejidos vegetativos de alfalfa madura y en proceso de floración, así como en megagametofitos de coníferas que no contienen GLM, lo cual pueden implicar funciones distintas a la de degradación de las paredes de mananos; tal vez este sea el caso en la testa de *I. purpurea* durante el desarrollo.

#### **E.- Enzimas Hidrolíticas durante la Germinación y Postgerminación.**

En semillas de leguminosas endospermicas, la movilización de GLM durante la postgerminación es un proceso bioquímico ampliamente comprendido. En el proceso están involucradas tres enzimas hidrolíticas;  $\alpha$ -Galactosidasa, exo- $\beta$ -Mananasa ( $\beta$ -Manosidasa) y endo- $\beta$ -mananasa (Meier y Reid, 1982). Aún cuando existen diferencias en

los niveles de actividad de  $\beta$ -Manosidasa para algunas semillas (Reid y Meier, 1973; McCleary, 1983), se ha establecido que esta enzima participa en la movilización de GLM durante la germinación de semillas leguminosas.

La actividad de  $\alpha$ -Galactosidasa en *I. purpurea* se encontró durante la germinación, presentando un primer máximo en las primeras horas de imbibición, mas aún, durante la postgerminación, el nivel de actividad aumenta de manera significativa y coincide con la declinación en la cantidad de GLM (Fig. 29, 15). La actividad se localizó principalmente en el endospermo y en menor magnitud en embrión (Fig 29). Estos resultados coinciden con los reportados para varias semillas donde se ha demostrado que esta actividad incrementa durante la germinación (Dea y Morrison, 1975; Leung *et al.*, 1979). La  $\alpha$ -Galactosidasa localizada en el embrión de *I. purpurea* es sintetizada y compartimentalizada durante el desarrollo y posteriormente utilizada durante la germinación en la hidrólisis de los oligosacáridos de la serie de la rafinosa, mientras que en el endospermo la enzima que actúa en la degradación de GLM tal vez sea sintetizada *de novo* (Fig. 29, ver índices de correlación Tabla 3 y 4). Este análisis es apoyado por los estudios realizados durante la germinación de *Trigonella foenum-graecum* donde los niveles de  $\alpha$ -Galactosidasa en el embrión permanecen constantes, mientras que en el endospermo incrementan rápidamente paralelo a la degradación del GLM, sugiriéndose que la  $\alpha$ -galactosidasa del embrión es responsable de la degradación de los nRaf (Reid y Meier, 1973). McCleary y Matheson (1974) ha demostrado la presencia de formas multimoleculares de  $\alpha$ -Galactosidasa (designadas como A, B y C) durante la germinación de *Medicago sativa*, *Cyamopsis tetragonolobus*, *Ceratonia siliqua*, *Gleditsia triacanthos* y soya. La Forma A esta presente en semillas deshidratadas y sus niveles no incrementan significativamente en la germinación. Se ha sugerido que las formas A y B están confinadas al cotiledón-embrión y son responsables principalmente de la hidrólisis de oligosacáridos  $\alpha$ -D-galactosidicos. La forma C es una enzima endospermica que tiene una alta especificidad por la hidrólisis de GLM, y se sabe que se incrementa rápidamente durante la germinación. Es probablemente que las  $\alpha$ -Galactosidasas localizadas por estructura en *I. purpurea* sean isoenzimas y su síntesis sea controlada de diferente forma durante el desarrollo y germinación (Fig. 35). La enzima del embrión invariablemente es sintetizada durante el desarrollo y activada durante la germinación, sin embargo la enzima involucrada en la degradación del GLM parece que se sintetiza *de novo*.

PARAMETROS	CORRELACION	VALOR-P
GLM, $\alpha$ -GLT	-0,99	< 0,0001
GLM, $\beta$ -MSD	0,944	< 0,0005
GLM, $\beta$ -MNN	-0,993	< 0,005
$\alpha$ -GLT, $\beta$ -MSD	-0,95	< 0,005
$\alpha$ -GLT, $\beta$ -MNN	0,967	< 0,05

222872

Tabla 3 Análisis de correlación entre las actividades enzimáticas y GLM durante la germinación y postgerminación de *Ipomoea purpurea*. Los valores de P son menores a 0.05. Abreviaciones igual que en figuras.

Con respecto a los niveles de actividad de  $\beta$ -manosidasa en *I. purpurea* se presentaron comportamientos distintos, resultado de la extracción a pH 5.0 y pH 8.0 (Fig. 31-32). De acuerdo con McCleary (1983) las diferencias en los comportamientos de esta enzima se deben principalmente al proceso de extracción. Se ha postulado a manera de hipótesis que la enzima se localiza adosada a la pared celular, por lo que es necesario utilizar pH alcalinos y una alta fuerza iónica (McCleary, 1983; Ouellette y Bewley, 1986). Los resultados obtenidos a pH 5.0 demuestran que en el germinado completo la actividad aumenta gradualmente y coincide con la degradación de GLM, sin embargo por estructura no se observa este incremento, por el contrario, se determinó que en endospermo la actividad disminuye (Fig. 31). Estos resultados contrastan con los obtenidos en *T. foenum-graecum* por Reid y Meier (1973) y los observados en *Lactuca sativa* por Leung *et al* (1979), en los cuales se demuestra la presencia de esta enzima en el embrión y el endospermo en todos los estadios de germinación. Estructuralmente encontraron que el embrión presenta bajos niveles de la enzima y no muestra incremento durante la germinación, sin embargo la  $\beta$ -manosidasa del endospermo incrementa 10 y 4 veces respectivamente su actividad y este incremento coincide con la desaparición de GLM.

Bajo la extracción a pH 8.0 se encontró que en el germinado intacto la actividad es alta y posteriormente disminuye en forma paralela a la desaparición de GLM, la principal actividad se localiza en el endospermo (Fig. 32). A pesar de que los niveles de actividad son bajos, al parecer son suficientes para degradar los mano-oligosacáridos producidos durante la postgerminación. Durante las primeras horas de imbibición la actividad de esta enzima se mantiene alta y constante, por lo que es probable que esté involucrada en la degradación de mano-oligosacáridos presentes en la semilla y que no son producto de la degradación de GLM. Los comportamientos de actividad presentados en *I. purpurea* son similares a los de estudios realizados por McCleary y Matheson (1975) para distintas leguminosas y con los estudios de McCleary (1983) en *Cyamopsis tetragonoloba*. En *I. purpurea* se puede observar que a nivel de endospermo no hay un incremento en la actividad de  $\beta$ -manosidasa durante la degradación de GLM. En este caso la actividad se mantiene constante hasta que inicia la degradación de GLM, posteriormente decrece la actividad. En el embrión-plántula los niveles de la enzima aumentan ligeramente durante la germinación y después declinan (Fig. 35). Oullette y Bewley (1986) ha reportado que la actividad de esta enzima se encuentra exclusivamente en los cotiledones asociada a la fracción celulósica y sus niveles de actividad no cambian durante y después de la germinación. Los datos obtenidos durante el desarrollo apoyan la idea que esta enzima es sintetizada durante esta etapa y utilizada durante la germinación y debido a su localización en diferentes estructuras, es posible que se trate de isoenzimas. Por lo tanto en *I. purpurea* esta enzima es sintetizada durante el desarrollo tanto en el endospermo como en el embrión y únicamente durante la germinación es activada y cumple funciones de degradación de manooligosacáridos de GLM (Fig. 32 y 35, ver Tabla 3 y 4).

PARAMETROS	CORRELACION	VALOR-P
GLM, $\alpha$ -GLT(T-E)	-0,973	< 0,0001
GLM, $\beta$ -MSD (T-E)	0,975	< 0,0001
GLM, $\beta$ -MSD (EMB)	0,83	< 0,05
GLM, $\beta$ -MNN(T-E)	-0,999	< 0,005
GLM, $\beta$ -MNN(EMB)	-0,993	< 0,005

Tabla 4 Análisis de correlación entre las actividades enzimáticas por estructura y GLM durante la germinación y postgerminación de *Ipomoea purpurea*. Los valores de P son menores a 0.05. Abreviaciones igual que en figuras.

Por último, dentro del proceso de degradación de GLM, la acción de la  $\beta$ -mananasa en *I. purpurea* aumenta drásticamente y posteriormente disminuye, esta actividad se localiza principalmente en endospermo. El aumento en la actividad de la enzima está íntimamente correlacionado con la disminución de GLM (Fig. 33, Tabla 3 y 4). Al igual que en otras semillas, la actividad de  $\beta$ -mananasa incrementa al inicio de la postgerminación (36 hrs), pero posteriormente decreciente en forma paralela a la degradación de GLM en el endospermo (Halmer *et al.*, 1976; McCleary y Matheson, 1975; McCleary, 1978; DeMason *et al.*, 1985; Bewley y Reid, 1985). Estos patrones de actividad son consistentes con los observados en *T. foenum-graecum* por Reid y colaboradores (1973 y 1977) en donde demuestran que la enzima localizada en el endospermo incrementa 4 veces su actividad y alcanza un máximo entre las 42-48 hrs de imbibición. Por lo tanto al igual que en otras semilla (Toorop *et al.*, 1996) la presencia de  $\beta$ -mananasa en el endospermo de *I. purpurea* juega un rol importante en los procesos catabólicos, permitiendo al embrión la absorción de los esqueletos provenientes del GLM. Por otro lado, en el embrión de *I. purpurea* se detectó actividad de  $\beta$ -mananasa, pero los niveles de actividad fueron significativamente menores a los del endospermo (Fig. 33). McCleary y Matheson (1975) no detectan actividad alguna en esta estructura. Sin embargo otros estudios han demostrado ampliamente la presencia de  $\beta$ -mananasa en el embrión (Halmer *et al.*, 1978; Dirk *et al.*, 1995). En semillas de tomate (*Lycopersicon sculentum*) se observó que la actividad de  $\beta$ -mananasa en el embrión aumentan drásticamente hacia las 40-60 hrs de imbibición y posteriormente disminuye; esto sucede inicialmente en el eje y posteriormente en los cotiledones. Hasta el momento, la razón de los patrones de actividad de  $\beta$ -mananasa en el embrión permanece desconocida (Toorop *et al.*, 1996; Voigt y Bewley, 1996). Sin embargo y considerando otros estudios realizados a nivel de pared celular es muy probable que la enzima localizada en el embrión de *I. purpurea* pueda estar involucrada en la extensibilidad de la pared celular (parecido a otras proteínas de la pared), promoviendo el crecimiento celular (Schopfer y Plachy, 1985; Fry, 1993; McQueen-Mason y Cosgrove, 1995). Es claro que durante la germinación estas enzimas son sintetizadas *de novo*, ya que la encontrada durante el desarrollo está localizada en la testa y no se descarta la posibilidad de que se presenten varias isoformas en diferentes estructuras de la semilla tal y como se ha establecido en tomate (Fig. 35).

Se ha propuesto que la  $\beta$ -mananasa no solo juega un rol importante en la movilización de reservas, sino que también cumple funciones importantes en el proceso de germinación. En este sentido se ha asociado la presencia de esta enzima en la región micropilar de tomate con el adelgazamiento de las paredes celulares del endospermo lo que permite la penetración y posterior protrusión de la radícula (Nonogaki *et al.*, 1992; Groot *et al.*, 1988; Ni y Bradford, 1993; Leviatov *et al.*, 1995; Nomaguchi *et al.*, 1995). Sin embargo recientemente se ha establecido que la presencia de esta enzima en la región micropilar no es suficiente para permitir el adelgazamiento de las paredes del endospermo y la germinación (Toorop y Bewley, 1996; Voigt y Bewley, 1996; Still y Bradford, 1997; Duta *et al.*, 1997; Dahal *et al.*, 1997). En la semilla de *I. purpurea* será importante establecer en un futuro si esta enzima se localiza en la región micropilar y si existe correlación con el proceso de germinación.

#### F.- Actividad Amilolítica durante la Germinación y Postgerminación.

Si bien las semillas de las leguminosas endospermicas no almacenan almidón en la madurez, debido a que el principal carbohidrato de reserva es el GLM localizado en el endospermo, durante la postgerminación Nadelmann (1889) observó por vez primera la formación de gránulos de Alm en los cotiledones justo cuando el endospermo desaparecía. A partir de ese estudio se ha establecido de manera general que durante la fase final de movilización de GLM, se acumula de manera transitoria Alm en los cotiledones (Reid, 1971; Dey, 1978). En *I. purpurea* se encontró de manera clara esta relación. El Alm se acumula entre las 36 y 48 hrs de imbibición, una vez que el GLM ha desaparecido del endospermo (Fig. 18 y 21).

El estudio realizado en semillas de *Trigonella foenum-graecum* por Bewley y colaboradores (1993) demostró que la acumulación transitoria de ALM en los cotiledones estaba acompañada de la presencia de amilasa soluble. Los niveles de actividad incrementan cuando el Alm comienza a desaparecer, sugiriendo que el aumento en el recambio y utilización del almidón temporal comienza después de este tiempo. Al igual que en ese estudio, se encontró que en *I. purpurea* la actividad amilolítica soluble se detecta desde el inicio de la imbibición y aumenta entre las 48 y 72 hrs de imbibición (Fig 36), periodo en el cual la concentración de Alm disminuye notablemente. Estos resultados indican una relación directa entre la actividad amilolítica y la desaparición de ALM. Diaz-Pontones (1992) demostró que durante el desarrollo de la semilla *I. purpurea* la actividad amilolítica aumenta en el primer tercio del desarrollo junto con la desaparición del Alm de la cubierta seminal. En ese estudio la actividad de la enzima se midió a pH 6.0 y 4.8 encontrando actividad en ambos pH. Una forma de comprobar que la enzimas involucradas en la degradación de Alm tanto en el desarrollo como en la germinación no son las mismas fue medir la actividad amilolítica no solo a pH 5.6 como lo propone Bewley *et al* (1993), sino medirla también a pH 6.0 y 4.8. No se detectó actividad a pH 6.0, sin embargo a pH 4.8 se encontró que la actividad presenta un máximo a las 36 hrs de imbibición. La actividad determinada mayoritariamente como alfa amilasa es constante, mientras que la

beta amilasa presenta el mismo comportamiento que la actividad total (Fig. 36). Por lo tanto es claro que las enzimas involucradas en la degradación de Alm de *I. purpurea* son distintas para desarrollo y germinación. Esto se ha demostrado en otras semillas (Chrispeels y Varner, 1967; García-Maya et al., 1990).

### G.- Modelo de Movilización de Carbono en *Ipomoea purpurea*.

A partir de los resultados obtenidos es posible establecer un modelo de movilización de carbono en la semillas de *Ipomoea purpurea*. El aporte de carbono por parte de la planta madre, su posterior acumulación, transformación y utilización están caracterizadas por los diferentes estadios fisiológicos y de desarrollo por lo cuales pasa la semilla hasta establecerse como una nueva plántula. Durante el desarrollo que comprende desde la antesis hasta la semilla madura deshidratada, la semilla acumula carbohidratos de manera diferencial. Así durante los primeros estadios de desarrollo la glucosa se acumula en la testa, al mismo tiempo que el almidón se degrada en la misma estructura. La glucosa se origina de la sacarosa proveniente de la planta madre y sirve para la síntesis de almidón, el cual a su vez se degrada hacia la mitad del desarrollo y libera este azúcar. Las proporciones glucosa/fructosa apoyan este hecho, ya que al inicio del desarrollo de la cubierta seminal la proporción se mantiene cercana a uno, pero posteriormente incrementa cuando se produce la hidrólisis de almidón. De acuerdo a estas mismas proporciones la glucosa se acumula en el endospermo debido a la hidrólisis de sacarosa. La fructosa que presenta el mismo comportamiento por estructura que la glucosa, proviene únicamente de la hidrólisis de sacarosa. La concentración de ambas hexosas es elevada durante la primeras etapas de desarrollo en el embrión, sin embargo hacia el final del desarrollo se acumula sacarosa en la testa, el endospermo y el embrión.

Además los patrones de acumulación de hexosas y sacarosa se encuentran íntimamente relacionados con el estado de desarrollo morfológico de *I. purpurea*, ya que en las primeras etapas de desarrollo cuando se acumulan estas hexosas se da la diferenciación del embrión (desde globular hasta cotiledonal) y del endospermo (de la fase nuclear a celular), coincidiendo con el papel propuesto en el crecimiento y división celular. Durante las etapas finales se acumula sacarosa en las tres estructuras, las cuales inician un periodo de síntesis de productos de almacenamiento.

Uno de estos productos de acumulación es el galactomanano, el cual se acumula únicamente en el endospermo a partir de la mitad del desarrollo hasta obtener un máximo en la etapa de semilla madura hidratada. La acumulación de GLM está relacionada con el decremento en la cantidad de almidón a nivel de cubierta seminal y galactosa en el endospermo, así como el aumento en las pozas de sacarosa y en menor proporción de glucosa y fructosa en endospermo. Es posible por lo tanto establecer que estos carbohidratos son las fuentes de carbono disponibles para la síntesis de éste polisacárido. La aparición de galactomanano coincide con la celularización del endospermo (ya que es a nivel de pared celular donde se acumula) y el incremento en el peso fresco de la semilla.

La detección de cantidades mínimas de  $\alpha$ -galactosil oligosacárido durante el desarrollo indican que no se alcanzó el periodo donde se da la síntesis de este oligosacárido, ya que en la semilla madura deshidratada se encuentran cantidades elevadas de nRaf, la cual se determinó como verbascosa. Al parecer la síntesis se presenta en el periodo considerado como desecación y de acuerdo a las concentraciones encontradas la síntesis se da a partir de la sacarosa, glucosa y fructosa presente al final del desarrollo (Fig. 38A y B).

Durante el desarrollo se presenta actividad de  $\alpha$ -galactosidasa. En el endospermo esta enzima puede estar involucrada en las modificaciones de las proporciones manosa/galactosa del GLM. La presencia de  $\alpha$ -galactosidasa a nivel del embrión está vinculada con la degradación de los azúcares de la serie de la rafinosa durante el proceso de germinación. Es probable que esta enzima sea sintetizada y compartamentalizada durante este período y utilizada durante la germinación. Los niveles de  $\beta$ -manosidasa también aumentan en el endospermo y el embrión. Es probable que al igual que la  $\alpha$ -galactosidasa esta enzima se encuentre compartamentalizada ya que la función que se le ha atribuido es de movilización de GLM y se presenta durante la germinación y postgerminación.

Durante la imbibición de la semilla se pueden observar tres fases: germinación (0-24 hrs), postgerminación temprana (24-48 hrs) y postgerminación tardía (48-72 hrs). La emergencia de la radícula se da hacia las 24 horas de imbibición. A partir de este punto, la longitud de la radícula así como el peso fresco aumentan con respecto al tiempo de imbibición. Durante la fase de germinación se consumen la verbascosa (nRaf) localizada a nivel del embrión por acción de la  $\alpha$ -galactosidasa localizada en esa estructura. La cantidad mínima de galactosa encontrada demuestra que ésta no se acumula en forma considerable y tal vez sea utilizada rápidamente en el metabolismo respiratorio o en la síntesis de pared celular.

Durante esta misma fase el GLM del endospermo permanece constante, sin embargo las cantidades comienzan a disminuir en la postgerminación temprana, justo cuando se da el aumento de la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -mananasa a nivel del endospermo. La actividad de la  $\beta$ -manosidasa disminuye paralelamente con el GLM y al parecer esta enzima tiene un papel menos importante durante la movilización de este polisacárido. Es importante puntualizar que la galactosa que constituye el esqueleto del GLM es removida 12 horas antes de iniciada la movilización total del GLM por acción de la  $\alpha$ -galactosidasa. Esta diferencia puede reflejarse indirectamente como parte de las estrategias de establecimiento de la plántula.

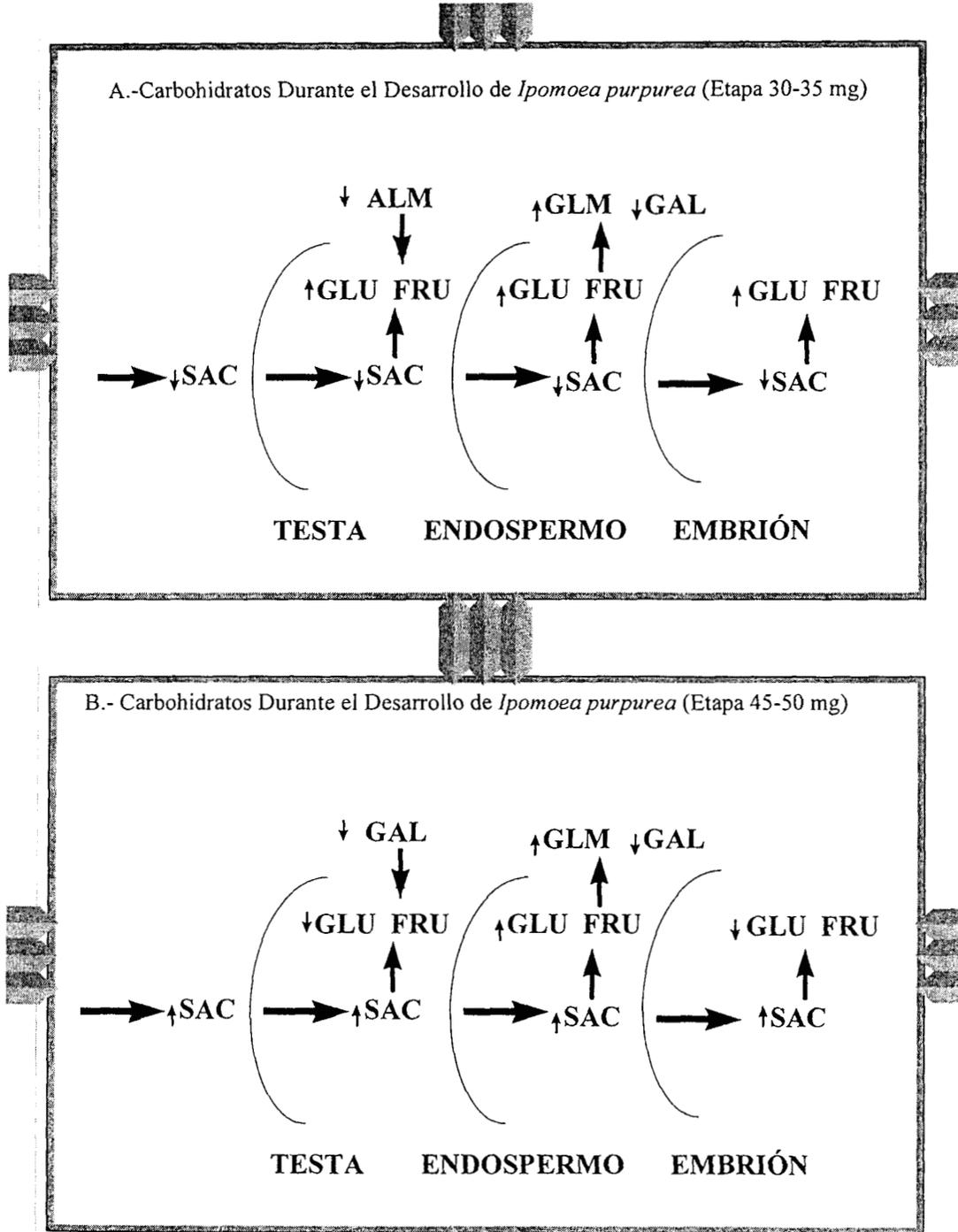


Fig. 38. Esquema de movilización de carbohidratos durante el desarrollo de la semilla *Ipomoea purpurea*. A.- etapa de 30-35 mg y B.- etapa de 45-50 mg de peso fresco.

La secuencia de movilización de GLM indica que al ser degradado en GLM del endospermo, los esqueletos de carbono provenientes de éste son absorbidos por los cotiledones para dar lugar al aumento en la concentración de Sac y la acumulación de Alm. Estos últimos son transitorios, ya que en la postgerminación tardía son degradados en el embrión-plántula para dar lugar al aumento de las pozas de Glu y Fru. Este hecho es apoyado por el aumento en la actividad amilolítica durante la fase en la que el Alm desaparece. La sacarosa es trasladada al eje muy probablemente y ahí es hidrolizada para dar origen a la Glu y la Fru donde se acumulan en forma considerable (Fig. 39).

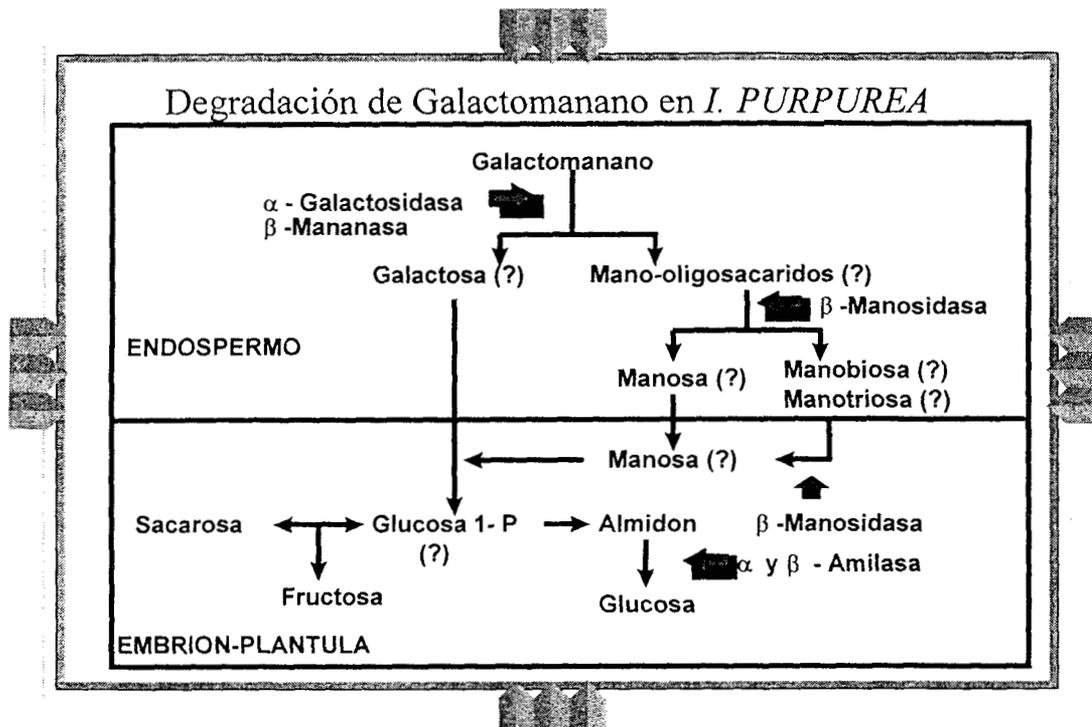


Fig. 39. Esquema de movilización de carbohidratos durante la germinación y postgerminación de la semilla *Ipomoea purpurea*. A.- etapa de 30-35 mg y B.- etapa de 45-50 mg de peso fresco.

Es claro que los esqueletos de carbono provienen durante el desarrollo de la planta madre, se acumulan de manera inicial en la testa en forma de almidón y posteriormente estos esqueletos son transferidos al endospermo en forma de galactomanano. Durante la postgerminación, la fuente de carbono almacenada en el endospermo es transferida y transformada a manosa y galactosa para ser asimilada por los cotiledones, en los cuales se sintetiza sacarosa y almidón. En la plántula, el almidón es degradado y los esqueletos resultantes en forma de sacarosa son exportados hacia las zonas de crecimiento como la radícula para funcionar como fuentes disponibles de energía al ser hidrolizados en glucosa y fructosa. Por lo tanto se establece que existe una distribución espacio-temporal de la fuente de carbono en esta semilla.

## CONCLUSION

---

- 1.- Durante el desarrollo de la semilla se acumulan carbohidratos solubles. La glucosa tiene un máximo de acumulación hacia la mitad del desarrollo, encontrándose principalmente en la testa. La fructosa (Fru) se mantiene constante durante el desarrollo, descendiendo en la testa y acumulándose en el endospermo y embrión. Con respecto a la sacarosa (Sac), ésta se acumula únicamente hacia el final del desarrollo en las tres estructuras. La cantidad de galactosa (Gal) y oligosacáridos de galactosa (sRaf) se mantienen en cantidades traza. A nivel del endospermo se acumula GLM a partir de la mitad del desarrollo. La acumulación de GLM puede ser utilizada como un marcador de desarrollo del endospermo y de la semilla.
- 2.- Durante la germinación y postgerminación existe un aumento en el peso fresco y la longitud de radícula con relación al tiempo de imbibición; sin embargo, el peso seco se mantiene constante.
- 3.- Durante la fase de germinación (0-24 hrs) se encontró que los sRAF (verbascosa) localizados únicamente en el embrión se consumen.
- 4.- En la postgerminación (24-48 hrs), el GLM se consume totalmente y aparecen a nivel del embrión pozas transitorias de SAC y ALM junto con el inicial aumento de Glu y Fru.
- 5.- En la última fase de estudio (48-72 hrs) descienden las pozas de Sac y Alm y se acumulan Glu y Fru.
- 6.- Con respecto a las enzimas involucradas en la degradación de GLM, durante el desarrollo la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa se incrementa principalmente en el embrión mientras que la actividad de  $\beta$ -manosidasa se incrementa en el embrión y endospermo. A nivel de la testa se detecta una actividad baja de  $\beta$ -mananasa.
- 7.- Durante la germinación y postgerminación la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -mananasa a nivel del endospermo se incrementan conforme el GLM desaparece, sin embargo la actividad de la  $\beta$ -manosidasa disminuye paralelamente con el GLM.
- 8.- En el embrión la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa aumenta y al parecer está relacionada con la desaparición de los nRaf, la actividad de  $\beta$ -mananasa también aumenta y puede estar relacionada con la protrusión de la radícula. La actividad de la  $\beta$ -manosidasa se mantiene constante y al parecer está relacionada con la degradación de manoligosacáridos.
- 9.- La actividad amilolítica en la plántula aumenta conforme el Alm desaparece.
- 10.- En semillas de *Ipomoea purpurea*, el GLM es el polisacárido de reserva de mayor importancia, el cual se acumula durante el desarrollo en el endospermo y se utiliza durante la postgerminación para el establecimiento de la plántula.
- 11.- La acumulación de GLM está asociada a las pozas acumulables de Sac, Glu, Fru y Gal a nivel del endospermo.
- 12.- La disminución en la cantidad de GLM está correlacionada con la actividad de las enzimas  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa.
- 13.- La desaparición de GLM está correlacionada con la producción de pozas transitorias de Sac y Alm en el embrión, así como a la acumulación de Glu y Fru en la postgerminación.

## PERSPECTIVAS

---

En futuras investigaciones es necesario indagar acerca de las señales que controlan la síntesis y degradación de GLM así como determinar el papel específico de las enzimas involucradas en estos procesos. Quedará por establecer la función del GLM en la protección del embrión y en la nutrición de la nueva plántula. En este sentido y debido a la importancia comercial y agrícola que representa esta especie es prioritario realizar estudios exhaustivos, a nivel de desarrollo, desecación y germinación, utilizando herramientas a nivel celular y molecular que permitan discernir los mecanismos y estrategias bioquímicas que ha desarrollado esta especie en su proceso de adaptación a los cultivares. Estos estudios podrán aportar nuevos conocimientos que favorezcan a corto y largo plazo el control y utilización de la semilla *Ipomoea purpurea*.

## BIBLIOGRAFÍA.

---

Abdul-Hussain S y E Varriano-Marston (1982). Amylosis of pearl millet starch and its fractions by pearl millet alpha-amylase. **Cereal Chem.** 59: 351-355.

Adams CA, RW Rinne y MC Fjerstad (1980). Starch Deposition and Carbohidrase Activities in Developing and Germinating Soya bean Seeds. **Ann. Bot.** 45:577-592.

Aguilar AS y S Acosta (1975). Informe Anual. Combate de Malezas. INIA. SARH. México.

Agundis O (1984). Logros y Aportaciones de la Investigación Agrícola en el Combate de la Maleza. INIA. SARH. México

Andrews P, L Hough y JKN Jones (1952). Mannose-Containing Polysaccharide I. The Galactomannans of Lucerne and Clover Seeds. **J. Am. Chem. Soc.** 74:4029-4032.

Bailey RW (1971). En Chemotaxonomy of the leguminosae (Edit. Harbone JB, D Boulter y BL Turner) Academic Press, Londres Inglaterra. pp 503-541.

Barrat DHP y A Pullent (1984) Control of seed protein accumulation in field bean. **Ann. Bot.** 54:31-38.

Beleida A y E Varriano-Marston (1981). Pearl Millet amilases I. Properties of partially purified alpha amylase. **Cereal Chem.** 58: 433-437.

Bergmeyer, HV Bernt y E Gutmann (1974). In Methods of Enzymatic Analysis 2ªed. Verlag Chemie Academic Press N.Y. pp1172-1175.

Beuther HO (1984). In Methods of Enzymatic Analysis 3ªed. Verlag Chemie. Weinheim Deerfield Beach/Florida Basel. pp90.96, 104-112.

Bewley JD y M Black (1978). Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to germination. Springer-Verlang. Berlin Heidelber. N. Y.

Bewley JD y M Black (1985). Seeds Physiology of Development and Germination. Plenum Press N.Y.

Bewley JD, DWM Leung, S MacIsaac, JSG Reid y N Xu (1993). Transient starch accumulation in the cotyledons of fenugreek seeds during Galactomannan mobilization from the endosperm. **Plant Physiol. Biochem.** 31: 483-490.

Blackman SA, RL Obendorf y AC Leopold (1992). Maturation proteins and sugars in Desiccation Tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiol.** 100: 225-230.

Brechú-Franco AE (1980). Identificación del Galactomanano en la Semilla de *Turbina corymbosa* y Observación de los cambios en el endospermo Durante la Germinación. **Tesis Biol. Fac. Ciencias UNAM.** Méx.

Brechú-Franco AE, J Marquez-Guzmán y G Laguna-Hernández (1984). Cambios en el Endospermo Durante la Germinación de la Semilla *Turbina corymbosa* (L.) Raf Convolvulaceae. **Phyton.** 44:95-100.

Brechú-Franco AE, A García-Argáez, J Marquez-Guzmán, MC Pérez-Amador y F García-Jiménez (1990). Aislamiento y Caracterización del Galactomanano de semillas *Turbina corymbosa* (L.) Raf y de *Ipomoea murucoides* Roem & Schult (Convolvulaceae). **Phyton.** 51:103-105.

Brechú-Franco AE, RM Ponce-Salazar, GJ Marquez y G Laguna-Hernandez (1991). Respuesta anual de poblaciones de semillas viables de *Ipomoea purpurea* (Convolvulaceae) enterradas a diferentes profundidades. **Phyton.** 52: 105 - 112.

Brechú-Franco AE (1994). Potencial de infestación del banco de semilla recién formadas de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth (Convolvulaceae) maleza del maíz. **Tesis Doctoral Fac. Ciencias UNAM.** México.

Buckeridge MS y SMC Dietrich (1990). Galactomannans from Brazilian Legume Seed. **Revta Brazil Bot.** 13:109-112.

Buckeridge MS, VR Panegassi, DC Rocha y SMC Dietrich (1995). Seed galactomannans in the classification and evolution of the leguminosae **Phytochemistry.** 38:871-874

Campbell JMCA y JSG Reid (1982). Galactomannan formación and guanosine 5'-diphosphate-mannose: galactomannan manosyltransferasa in developing seeds of fenugreek (*Trigonelle foenum-graecum* L. leguminosae) **Planta.** 155: 105-111.

Chrispeels MJ y JE Varner (1967) Giberellic acid-enhancer synthesis and release of  $\alpha$ -amilase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. **Plant Physiol.** 42: 398-406.

Crowley RH y GA Buchanan (1980). Responses of *Ipomoea* species and smallflower Morningglory (*Jacquemontia tamnifolia*) to temperature and osmotic stresses. **Weed. Sci.** 28: 76-82.

Dahal P, DJ Nervins y KJ Bradford (1997). Relation of endo- $\beta$ -mannanase activity and cell wall hydrolysis in tomato endosperm to germinates rates. **Plant Physiol.** 113: 1243-1252.

## BIBLIOGRAFÍA.

---

Daniel JR y RL Whistler (1984). Guar Gum: Production Structure and Uses. In: Cereal Polysaccharides in Technology and Nutrition. American Association of Cereals Chemists. USA.

Dea ICM y A Morrison (1975). Chemistry and Interaction of seed Galactomannan. **Adv Carbohidr Chem Biochem**. 31: 241-312.

DeJong A (1996). Characterization of the uptake of sucrose and glucose by isolate seed coat halves of developing pea seeds. Evidence that a sugar facilitator with diffusional kinetics is involved in seed coat unloading. **Planta**. 96: 486-492.

DeMason DA R Sxton, M Gorman y JSG Reid (1985) Structure and biochemistry of the endosperm breakdown in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. **Protoplasma**. 126: 159-167.

Dey PM (1978). Biochemistry of Plants Galactomannans. **Adv Carbohidr Chem Biochem**. 35: 341- 376.

Díaz-Pontones DM (1992). Catabolismo del Almidón durante el Desarrollo de la Semilla de *Ipomea purpurea* (L.) Roth. **Tesis Doctoral Fac. Ciencias UNAM**.

Díaz-Pontones DM, J Marquez, M Domínguez y H Becerril (1991). Utilización de los Carbohidratos de Reserva por las semillas de Angiospermas, durante la germinación. **Contactos**. 3:50-56

Díaz-Pontones DM, M Ponce-Salazar, H Becerril, y J Márquez (1992). Desarrollo de la Semilla de *Ipomea purpurea* (L.) y su Relación con la Cantidad de Almidón. **Phyton**. 53:103-109

Díaz-Pontones DM, S García-Lara, M Ponce-Salazar y J Márquez-Guzmán (1996). Galactomannan ( $\alpha$  1-6 Galactosil  $\beta$  1-4 Mannan) Content Changes in Developing *Ipomoea purpurea* Seed. **Bol.Est. Méd. Biol**. 44: 37-110.

Dirk LMA. AM Griffen, B Downie y JD Bewley (1995) Multiple isoenzymes of endo- $\beta$ -D-mannanase in dry and imbibed seeds. **Phytochemistry**. 40: 1045-1056.

Downie B, HWM Hilhorst y JD Bewley (1994). A new assay for quantifying endo- $\beta$ -D-mannanase activity using congo red dye. **Phytochemistry**. 4: 829-835.

Dutta S, JK Bradford y DJ Nevins (1997). Endo- $\beta$ -mannanase activity present in cell wall extracts of lettuce endosperm prior to radicle emergence. **Plant Physiol**. 113: 155-161.

Edwards M, PV Bulpin, ICM Dea y JSG Reid (1989). Biosynthesis of Legume-Seed Galactomannans in Vitro. Cooperative Interaction of a Guanosine 5'-diphosphate-mannosa Linked (1-4)- $\beta$ -D-mannosyltransferasa and a Uridine 5'-diphosphate galactose-Linked  $\alpha$ -D-galactosyl transferasa in Particular Enzyme Preparations from Developing Endosperm of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) and Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* [L.] Taub) **Planta** 178:41-51.

Edwards M, C Scott, MJ Gidley y JSG Reid (1992). Control of Mannose/Galactose Ratio During Galactomannan Formation in Developing Legume Seeds. **Planta** 187:67-74.

Esau K (1985). Anatomía Vegetal. 3ª ed. Omega. Barcelona España.

Flores J (1970). Estudio Morfológico en 98 Plantas Arvenses del Valle de México. **Tesis Esc. Nal. de Cien. Biol. IPN**. México.

Fry SC (1993). Lossening the ties. A new enzyme, with cuts and then re-forms glycosidic bonds in the cell wall, may hold the key to plant cell growth. **Curre Biol.** 3: 355-357.

Ganter JLMS, M Milas, JBC Corrêa, F Reicher y M Rinaudo (1992). Study of solutions propieties if galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. **Carbohydr. Polym.** 17: 171-175.

García-Maya M, Chapman KM y M Black (1990). Regulation of  $\alpha$ -amilase formation and gene expression in the developing wheat embryo. **Planta.** 181: 296-303.

García-Ochoa F y JA Casas (1992). Viscosity of Locus Bean ( *Ceratonia siliqua*) Gum Solutions. **J. Sci. Food Agric.** 59: 97-100.

González MS y I Penaloza (1984). Técnicas de Biomoléculas . ENEP-UNAM. México.

Govil CM (1971). Morphological Studies in the Family Convolvulaceae I. Development and Structure of the Seed Coat. **J. Indian Bot. Soc.** 50:32-39.

Groot SPC, B Kieliszewsha-Rokicka, E Vermeer y CM Karssen (1988). Giberellin induce hidrolisis of endosperm cell walls in giberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protusion. **Planta.** 174: 500-504.

Halmer P, JD Bewley y TA Thorpe (1976). An enzyme to degrade lettuce endosperm cell walls. Appearance of a mannanase following phytochrome- and gibberellin-induced germination. **Planta.** 130: 189-196.

Halmer P, JD Bewley y TA Thorpe (1978) Degradation of the endosperm cell walls of *Lactuca sativa* L. cv Grand Rapids. Timing of mobilization of soluble sugars, lipid and phytate. **Planta**. 139: 1-8.

Harborne JB (1991). Phytochemical Methods. 2ª ed. Chapman and Hall N.Y.usa. pp 222-242.

Jann CR y DR Amen (1977). What is germination ? en: Khan AA. The physiology and biochemistry of seed dormancy. North-Holland publishing company N.Y.

Kabat EA, MM Mayer (1968) Inmunoquímica Experimental. 2a ed. Prensa Mexicana. Mex. pag: 471-508

Kappoor VP, M Milas, FR Taravel y M Rinaudo (1994). Rheological propieties of seed galactomannan from *Cassia nodosa* buch-hem. **Carbohidr. Polym.** 25: 79-84.

Kaur H y RP Singh (1970). Structure and Development of Seeds in Three *Ipomoea* Species. **J. Indian Bot. Soc.** :168-174.

Khanna SN y PC Gupta (1967). The Structure of a Galactomannan from the Seeds of *Ipomoea muricata*. **Phytochemistry** 6:605-60.

Koster KL y AC Leopold (1988). Sugar and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiol.** 88:829-832.

Koster KL (1991). Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiol.** 96:302-304.

Kuo IM, JF Vanmiddlesworth y WJ Wolf (1988). Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. **J. Agric. Food Chem.** 36: 32-36.

Kurz G y K Wallenfels (1974). In Methods of Enzmatic Analysis 2ª ed. Verlag Chemie. Academic Press. N. Y and London.

Lambrechts H, F Rook y C Kollöffel (1994). Carbohydrate Status of Tulip Bulbs During Cold-Induced Flower Stalk Elongation and Flowering. **Plant Physiol.** 104:515-520.

Larson EB y F Smith (1955). The Constitution of the Galactomannan of the Seed of the Kentucky Coffe bean. **J. Am. Chem. Soc.** 77:429-432.

## BIBLIOGRAFÍA.

---

- Leung DWM, JSG Reid y JD Bewley (1979). Degradation of the endosperm cell walls of *Lactuca sativa* L., cv Grand Rapids in relation to the mobilization of proteins and the production of hydrolitic enzymes in the axis, cotyledons and endosperm. **Planta**. 146: 335-341.
- Leviatov S, JSG Reid y JD Bewley (1995). Involvement of endomannanase in the control of tomato seed germination under low temperature conditions. **Ann Bot**. 76: 1-6.
- Lopez-Curto L, J Marquez, G Laguna y M Ponce (1990). Ciclo de Vida y desarrollo de la Semilla *Ipomoea x leucantha* (Convolvulaceae) Arvense de Arroz. **Phyton**. 51:17-24.
- Lowell CA y TM Kuo (1989). Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing soybean seeds. **Crop Sci**. 29:483-486.
- MacDonald R, S Fieuw y JW Patrick (1996). Sugar uptake by the dermal transfer cells of developing cotyledons of *Vicia faba* L. Experimental systems and general transport properties. **Planta**. 198: 54-63.
- Malek L y JD Bewley (1991). Endo- $\beta$ -mannase activity and reserve mobilization in excised endosperms of fenugreek is affected by volume of incubation and abscisic acid. **Seed Science Res**. 1:45-49
- Mallet I, BV McCleary y NK Matheson (1987). Galactomannan changes in developing *Glesitsia triacanthos* seeds. **Phytochemistry**. 26: 1889-1894.
- Martin C y AM Smith (1995). Starch Biosynthesis **Plant Cell**. 7: 971-985
- Matsudomi N, T Tsujimoto, A Kato y K Kobayashi (1994). Emulsifying and Bactericidal Properties of a protamine-Galactomannan Conjugate Prepared by Dry Heating. **J. Food Sci**. 59: 97-100.
- McCleary BV (1978). Purification of a  $\beta$ -mannanase enzyme from lucerne seeds by substrate affinity chromatography. **Phytochemistry**. 17: 71-80
- McCleary BV (1983). Enzymatic interactions in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of exo- $\beta$ -mannanase. **Phytochemistry**. 22: 649-658.
- McCleary BV y NK Matheson (1974).  $\alpha$ -D-Galactosidase activity and Galactomannan and Galactosylsucrose oligosaccharide depletion in germinating legume seeds **Phytochemistry**. 13: 1747-1757.

## BIBLIOGRAFÍA.

---

- McCleary BV y NK Matheson (1975). Galactomannan structure  $\beta$ -mannanase and  $\beta$ -mannosidase activity in germinating legume seeds **Phytochemistry**. 14: 1187-1194.
- McCleary BV y NK Matheson (1983). Action patterns and substrate-binding requirements of  $\beta$ -mannanase with mannosacharides and mannan-type polysaccharides. **Carbohydr. Res.** 139: 191-219.
- McCleary BV y NK Matheson (1986). Enzymatic analysis of polisaccharide structure. **Adv Carbohidr Chem Biochem**. 44: 147-276
- McQueen-Mason SJ y DJ Cosgrove (1995). Expansin model of action an cell walls. Analysis of wall hidrolisis, stress relaxation, and dinding. **Plant Physiol**. 107: 87-100.
- Meier H y JSG Reid (1977). Morfological Aspects of Galactomannan Formation in the Endosperm of *Trigonella foenum-graecum* L. (Leguminosae). **Planta**. 133:243-248.
- Meier H y JSG Reid (1982). Reserve Polisaccharides other than Starch in Higher Plants In: **Encyclopedia of Plant Physiology**. Springer. Berlin Heidelberg. N. Y.
- Murray D (1984). Nutrition of the Angiosperm Embryo. Research Studies Press. N.Y. pp 246.
- Murray D (1988). Seed Physiology. Academic Press. N.Y. USA.
- Nadelmann H (1889). Uber die schleimendosperme der leguminosen. **Pringheim's Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik**. 21: 1-83.
- Ni BR y KJ Bradford (1993). Germination and dormancia of abscisic acid and giberellin - deficient mutant tomato (*Lycopersicum esculentum*) seeds. Sensitiving of germination to abscisic acid, giberellin and water potencial. **Plant Physiol**. 101:607-617.
- Nomaguchi M, H Nonogaki y Y Morohashi (1995). Development of galactomannan-hidrolising activity in the micropylar endosperm tip of tomate seed prior to germination. **Physiol Plant**. 94: 105-109.
- Nonogaki H, H Matsushima y Y Morohashi (1992).Galactomannan hydrolysing activity develops during priming in the micropylar endosperm tip of tomate seeds. **Physiol Plant**. 85: 167-172.
- Okamoto K y T Akazawa (1979). Enzimatic mechanisms of starch breakdown in germinating rice seed. **Plant Physiol**. 63: 336-340.

Ortega DML (1986) Manual de Practicas de Bioquímica. Centro de Botánica C.P. Chapingo Mex. pp3-28.

Ouellette BFF y JD Bewley (1986).  $\beta$ -Mannosidase mannohydrolase and mobilization of the endosperms cell wall of lettuce seeds, cv. Grand Rapids **Planta**. 169: 333-338

Ponce-Salazar RM, J Márquez-Guzmán, AE Brechú-Franco y G Laguna-Hernández (1990). Desarrollo e histoquímica de la cubierta seminal de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth (Convolvulaceae) y su relación con la impermeabilidad de la testa. **Phyton**. 51: 5-12.

Ponce-Salazar RM, D. Díaz-Pontones, MC Pérez-Amador y J Márquez-Guzman (1993). Ubicación y cuantificación de taninos y proteínas en la testa de *Ipomoea Purpurea* (L.) Roth en relación con la permeabilidad al agua. **Phyton** . 53: 37-43.

Preiss J y C Levi (1980). Starch Biosynthesis and Degradation. En: The Biochemistry of Plants Vol 3 Preiss Academic Press. N.Y.

Quick WP y AA Schaffer (1996). Sucrose metabolism in sources and sinks, in Photoassimilate distribution in plants and crops, sources- sink relationships. En Zamski, E. y Shaffer AA, Eds. pp. 115-156, Marcel Dekker.

Reid JSG y H Meier (1970). Formation of reserve galactomannan in the seeds of *Trigonella foenum-graecum*. **Phytochemistry**. 9: 513-520

Reid JSG (1971). Reserve Galactomannan Metabolism in Germination Seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (Leguminosae). **Planta**. 100:131-142.

Reid JSG y H Meier (1972). The Fuction of the Aleurone Layer During Galactomannan Mobilisation in Germinating Seeds of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) and Lucerne (*Medicago sativa* L.): A Correlative Biochemical and Ultrastructural Study. **Planta**. 106:44-60.

Reid JSG y H Meier (1973). Enzymatic activities and galactomannan movilisation in germinatig seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion the  $\alpha$ -galactosidase and  $\beta$ -mannosidase by the aleurone layer. **Planta**. 112:301-308.

Reid JSG, C Davies y H Meier (1977). Endo  $\beta$ -mannanasa, the Leguminous Aleurone Layer and the Storage Galactomannan in Germinating Seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. **Planta** 133:219-222.

Reid JSG y JD Bewley (1979). A Dual Role for the Endosperm and its Galactomannan Reserves in the Germinative Physiology of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L) and Endospermic Leguminous Seed. **Planta** 147:145-150.

## BIBLIOGRAFÍA.

---

Reid JSG (1985) En Biochemistry of storage Carbohydrates in Green Plants (Edit. Dey PM y TA Dixon) Academic Press, Londres Inglaterra. pp 265-288.

Reid JSG, M Edwards, MJ Gidley y AH Clark (1995). Enzyme especificity en Galactomannan biosynthesis **Planta**. 195: 489-495.

Saravitz DM, DM Pharr y TE Carter (1987). Galactinol Synthase Activity and Soluble Sugars in Developing Seeds of Four Soybean Genotypes. **Plant. Physiol.** 83:185-189.

Schopfer P y C Placy (1985). Control of seed germination by abscisic acid. III Efect on embryo growth potencial (minimum turgor pressure) and growth coeficient (cell wall extensibility) in *Brassica napus* L. **Plant Physiol.** 77: 676-686.

Seiler, A (1977). Galaktomannanabbau in Keimenden Johannisbrodsamen (*Ceratonia siliqua* L.) **Planta**. 134: 209-221.

Spyropoulos CG y JSG Reid (1985). Regulation of the  $\alpha$ -galactosidase activity and the hidrolisis of galactomannan in the endosperm of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seed **Planta**.166: 271-275.

Spyropoulos CG y JSG Reid (1988). Water stress and galactomannan breakdown in germinated fenugreek seeds. Stress affects the production and the activities in vivo of galactomannan-hidrolysing enzymes **Planta**.174: 473-478.

Sripleng A y FH Smith (1960). Anatomy of Seed of *Convolvulus arvensis* **Amer. J. Bot.** 47:386-392.

Still DW y KJ Bradford (1997). Endo- $\beta$ -mannanase activity from individual tomato endosperm caps and radicle tips in relation to germination rates. **Plant physiol.** 113: 21-29.

Tookey HL, RL Lohmar y IA Wolff (1962). New sources of seed mucilages. **Agric. Food Chem.** 10: 131-133.

Toorop PE, JD Bewley y HWM Hilhorst (1996). Endo- $\beta$ -mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. **Planta**. 200: 153-158.

Toorop PE y JD Bewley (1996). Developing tomato seeds when removed from the fruit produce multiples forms of germinative and post-germinative endo- $\beta$ -mannanase. Responses to desiccation, abscisic acid and osmoticum. **Planta**. 200: 71-77.

Turquois T, C Rochas y FR Taravel (1992). Rheological studies of synergistic Kappa carrageenan-carob galactomannan gels. **Carbohydr. Polym.** 25: 79-84.

Uebelmann G (1978). Samenkeimung bei *Trigonella foenum-graecum* L. Aufnahme der beim Galaktomannanabbau im Endosperm freiwerdenden zucker durch den embryon. **Z. Pflanzenphysiol.** 88: 235-253.

Walter E (1980). Zur Prüfung der Laborausrüstung für Enzymatische Bestimmungen. **Alimenta.** 19:159-164.

Weber H, L Borisjuk y U Wobus (1996a). Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* is controlled by concerted action of both sucrose phosphate synthase and sucrose synthase: expression pattern, metabolic regulation and implications for seed development. **Plant J.** 9: 841-850

Weber H, L Borisjuk y U Wobus (1996b). Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. **Plant J.**10: 823-834

Weber H, L Borisjuk y U Wobus (1997). Sugar import and metabolism during seed development. **Trends in Plant Science.** 2: 169-174.

Yemn EW y AJ Williams (1954). The estimation of Carbohydrates in Plant Extractions by Anthrone. **Biochem J.** 57:508-514.

Zambou K y CG Spyropoulos (1989). D-mannose uptake by fenugreek cotyledons. **Planta.** 179: 403-408.

Zambou K y CG Spyropoulos (1990). D-Galactose uptake by fenugreek cotyledons. **Plant Physiol.** 93: 1417-1421.

Zambou K, CG Spyropoulos, I Chinou y F Kontos (1993). Saponin-like substances inhibit  $\alpha$ -Galactosidase production in the endosperm of fenugreek seeds. **Planta.** 189: 207-212

---

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 17 de junio de 1998.



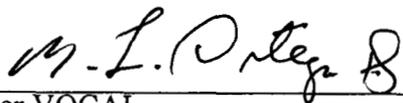
PRÉSIDENTE

Dr. David Díaz Pontones



SECRETARIO

Dra. Marina Gavilanes Ruíz



1er VOCAL

Dra. María Luisa Ortega Delgado.



2o VOCAL

Dra. Alicia Brechú Franco

---