

Littérature citée

1. BAZIRE-BENAZET, M. La ponte des ouvrières d'*Atta laevigata* Fred-Smith 1858 (Hymenoptera - Formicidae). C. R. Academie Sciences., Paris 270:1 614-1 615 1970.
2. PORTER, S. D. and BOWERS, M. A. Caste partitioned survivorship and route fidelity of leaf-cutting and workers. In BREED M. D., MICHENER C. D. and EVANS M. E. eds. The biology of social insects. Westview Press, 1982. 419 p
3. TORREGROSSA, J. P.; FEBVAY, G. and KERMARREC A. The larval instars of the worker caste in the attine ant, *Acromyrmex octospinosus* (REICH) (Hymenoptera, Formicidae). Colemania (sous presse). 1982.
4. WEBER, N. A. Gardening ants. The Attines. Memoirs of the American Philosophical Society 92:1-146. 1972.

Actividad amilásica durante la germinación del grano de trigo. Estudio electroforético.

Summary. The alpha and beta's amilase activities in extracts of seeds of wheat (Buck Manantial) matured and at different stages of germination was determined. In the matured seeds the main part of the activity belongs to beta amilasa. During germination alpha amilasa's activity increases until the sixth day. The disc electrophoresis in poliacrilamide and specific stains in extracts of riped seeds show two bands of quickly movement activity, while the seeds extracts at different periods of germination show the apparition of seven additional bands of slower movements

Las amilasas provienen de numerosas fuentes: bacterias, hongos, vegetales superiores y animales. Pertenecen a la categoría de las hidrolasas.

Las amilasas vegetales, debido a su efecto un poco distinto al desdoblar la molécula de almidón, se distinguen en alfa amilasas (EC 3.2.1.1) y beta amilasas (EC 3.2.1.2.) (4, 10).

Las actividades amilásicas influyen en la calidad de los granos de trigo y productos obtenidos a partir de ellos.

Se conoce desde 1960, que tanto las enzimas de origen animal como vegetal, se presentan en varias formas moleculares (8).

Kruger, en 1970, mediante estudios cromatográficos y electroforéticos en granos de trigo Hard Red Spring (HRS) maduros, separa dos formas moleculares de beta amilasa (5).

Durante la germinación de los granos de trigo canadienses HRS y empleando técnicas electroforéticas en poliacrilamida, se observan siete u ocho izoenzimas de la alfa amilasa (7).

Como en Argentina no se han realizado estudios a este respecto, el propósito del presente trabajo es conocer las actividades alfa y beta amilásicas y la composición amilásica en granos de trigo maduros y a diferentes días de germinación, para lo cual se adaptó una técnica de tinción específica para amilasas luego de los desarrollos electroforéticos.

Materiales y métodos

Preparación de extractos

Se trabajó con granos maduros de trigo, variedad Buck Manantial cosecha 1980-1981, provisto por la Estación Experimental INTA Marcos Juarez, Provincia de Córdoba, República Argentina.

Se molieron dos gramos de granos sanos y limpios en un molinillo eléctrico de paletas horizontales y la harina obtenida fue suspendida en 18 ml de agua destilada fría y homogeneizada en un mezclador de vidrio tipo Potter-Elvehjem durante dos minutos en cámara fría.

La suspensión obtenida fue agitada durante cinco minutos en un agitador eléctrico en cámara fría. Los extractos obtenidos fueron centrifugados a 6 000 x g a 4°C durante veinte minutos en una centrifuga refrigerada Sorvall modelo RC 2.

A fin de conseguir granos con distintos períodos de germinación (2, 4, 6 y 8 días) se colocaron granos de trigo sanos, limpios y maduros en cápsulas de Petri en ambiente saturado de humedad, las que fueron acondicionadas en cámaras que recibían 11 horas de luz diaria con una temperatura de 18-21°C.

Se suspendieron dos gramos de granos germinados, que habían sido privados cuidadosamente de todos sus nuevos tejidos (brotes y raíces) en 18 ml de agua destilada fría y tratados como se indicó anteriormente en el caso de los granos maduros.

Determinación de actividad enzimática

Los sobrenadantes límpidos obtenidos fueron utilizados para la determinación de actividades amilásicas de acuerdo al método descrito por Bernfeld (2), modificado Tkachuk y Kruger (11) y usando como sustrato almidón soluble Merck al 0.5%, de reciente preparación.

Se emplearon curvas de calibración efectuadas con una solución de maltosa, definiéndose como una unidad amilásica la cantidad de enzima que es capaz de liberar un micromol de maltosa o equivalentes reductores en un minuto a 30°C y a pH 5.5.

Para la cuantificación de actividades combinadas alfa más beta amilásicas se utilizó buffer acetato a pH 5.5. Simultáneamente se determinaron las actividades alfa amilásicas empleando buffer acetato a pH 5.5, previa inactivación de actividades beta amilásicas por calentamiento a 70°C durante 10 minutos a pH 6.7 (12).

El desarrollo final de la reacción colorimétrica fue medido en un espectrofotómetro Bausch y Lomb "Spectronic 20" a 540 nm.

Electroforesis

La separación electroforética en distintas zonas de actividad amilásica fue conseguida mediante el empleo de electroforesis en geles de poliacrilamida, los que fueron preparados de acuerdo a Davis (3), empleando una solución de acrilamida al 5.6% a pH 8.5. Se usaron tubos de vidrio de 7 mm de diámetro interno por 15 cm de largo. El gel de poro pequeño y el gel espaciador tenían siempre las mismas alturas en el interior de los tubos. El volumen del extracto sembrado presentaba una actividad de 20 unidades amilásicas, agregándose agua destilada en la cantidad necesaria a fin de que todos los volúmenes fuesen iguales. Con el objeto de prevenir la mezcla de los extractos sembrados en el buffer de corrida tris-glicina pH 8.3, fueron agregadas 3 gotas de solución de sacarosa saturada. Como marcador de corrida se usó azul de bromofenol.

Durante el desarrollo electroforético se empleó una corriente constante de 4 mA por tubo, deteniéndose cuando el marcador se encontró a 1 cm sobre el borde inferior del gel. El tiempo de desarrollo fue de aproximadamente dos horas y media.

Con el objeto de revelar específicamente las distintas zonas de actividad amilásica, se adaptó una técnica de tinción específica para amilasas, que consiste en sumergir los geles en una suspensión de almidón el 1% apropiadamente hidrolizado en buffer acetato a

pH 5.5 y llevados a 37°C durante una hora (1). A continuación, los geles fueron lavados 2 veces con agua destilada y sumergidos en una mezcla reveladora formada por partes iguales de lugol y ácido acético al 10% hasta la aparición de zonas claras sobre un fondo oscuro, desechándose en ese momento la solución reveladora y adicionándole a los tubos de ensayo que contienen a los geles ácido acético al 10%

Resultados

En la Figura 1 cada punto, tanto de la actividad total alfa más beta amilásica como de la actividad alfa amilásica, expresa el promedio de cinco determinaciones de actividades amilásicas por gramo de grano de cereal en función del tiempo de germinación. A su vez, cada punto de la actividad beta amilásica fue obtenido realizando la diferencia entre las actividades combinadas alfa más beta amilásicas y las actividades alfa amilásicas.

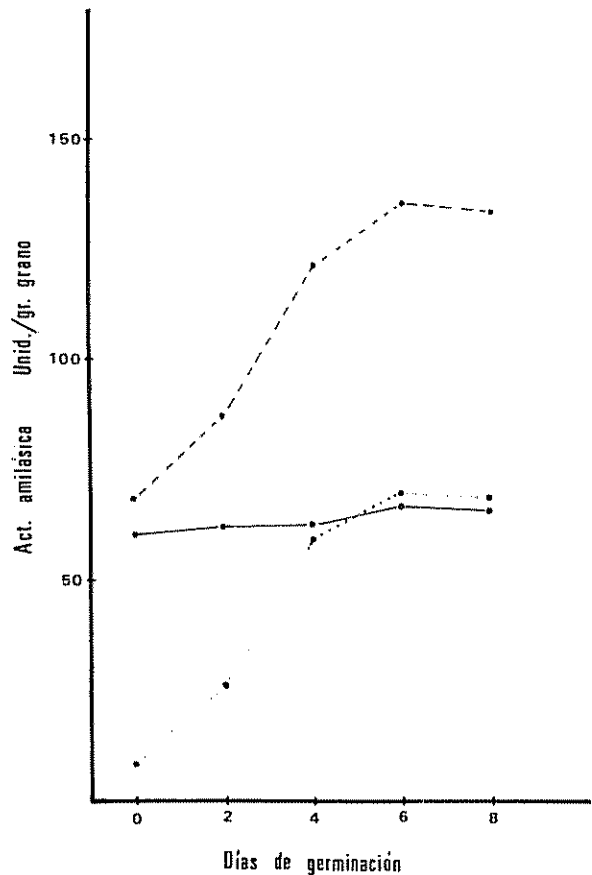


Fig 1 — — — Actividad amilásica combinada alfa más beta en granos maduros y a diferentes días de germinación.
 - · - · - · Actividad alfa amilásica en granos maduros y a diferentes días de germinación
 ——— Actividad beta amilásica en granos maduros y a diferentes días de germinación.

La observación de la Figura 1 permite apreciar que tanto la actividad total alfa más beta amilásica como la actividad alfa amilásica se incrementan marcadamente desde la iniciación de la germinación hasta el sexto día de la misma. A partir de ese momento comienzan a declinar. Al realizar estudio estadístico de los puntos consignados en dicha figura, se determina que las diferencias son significativas.

En la misma figura puede apreciarse que la actividad beta amilásica se incrementa ligeramente desde la iniciación de la germinación hasta el sexto día y luego tiende a decrecer. Al realizar estudio estadístico de los puntos consignados en dicha figura se observa que las diferencias son significativas hasta el sexto día.

Los desarrollos electroforéticos en geles de poliacrilamida, obtenidos con extractos de granos maduros y germinados y posteriormente revelados específicamente, se observan en la Figura 2.

En el primer trazado electroforético (A) aparecen 2 zonas de actividad amilásica. En los 2 siguientes trazados (B y C) se observa una mayor cantidad de zonas de actividad amilásica. En los 2 últimos trazados (D y E) se distinguen 9 zonas de actividad amilásica, 2 zonas más móviles que corresponden a las que aparecen en el primer trazado electroforético y 7 zonas adicionales de movimiento más lento.

Discusión

Se efectuó un estudio comparativo de las actividades amilásicas de granos de trigo maduros y en germinación de las siguientes variedades: Buck Manantial, Villela Sol, Klein Rendidor y Klein Atlas. Se encontró que la variedad Buck Manantial es la que mayor actividad amilásica combinada alfa más beta presenta,

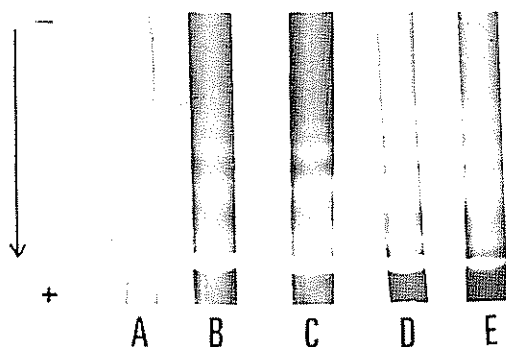


Fig 2 Los trazados A, B, C, D y E corresponden respectivamente a desarrollos electroforéticos y posteriores revelaciones específicas de extractos de: granos maduros sin germinar (A) y de granos germinados 2 días (B), 4 días (C), 6 días (D) y 8/días (E)

siguiéndole en orden decreciente Villela Sol, Klein Rendidor y Klein Atlas, con valores respectivamente del 88% , 75% y 74% de la actividad amilásica determinada en Buck Manantial.

Para la realización del presente trabajo se ha elegido la variedad Buck Manantial, trigo duro de invierno, hexaploide de 42 cromosomas.

La observación de los distintos valores de las actividades en la Figura 1 permite apreciar que:

- En los granos maduros la mayor parte de la actividad amilásica alfa más beta corresponde a actividad beta amilásica.
- Durante la germinación se produce un aumento de la actividad amilásica combinada alfa más beta hasta el sexto día, fundamentalmente a expensas de la actividad alfa amilásica, con valores que corresponden prácticamente al doble de los encontrados en granos maduros.
- La actividad alfa amilásica se incrementa grandemente al progresar la germinación, alcanzándose valores en el orden de las diez veces superiores al inicial.
- La actividad beta amilásica, por el contrario, aumenta en forma mucho menos notable al progresar la germinación.

Nuestras apreciaciones son concordantes con lo encontrado por Kruger (6) y Olered y Jönsson (9), quienes trabajando con trigos canadienses HRS han observado que las alfa amilasas, si bien están presentes en el desarrollo temprano del grano de trigo, tienden a desaparecer hacia la maduración final del mismo, no pudiéndose a veces detectarlas en granos maduros, y que a su vez las beta amilasas aparecen también en el desarrollo temprano del grano de trigo, incrementando su actividad hasta la maduración final. Las anteriores observaciones permiten estimar que en el trazado A de la Figura 2 las bandas que aparecen corresponderían a actividad beta amilásica.

También Kruger (7) y Olered y Jönsson (9) encontraron que las alfa amilasas aparecen nuevamente a partir del segundo día de germinación e incrementan su actividad al progresar la misma. De lo expresado anteriormente podríamos sugerir que en los trazados B, C, D y E de la Figura 2 las bandas adicionales a las dos presentes en el trazado A corresponderían a actividad alfa amilásica.

Se considera que se contribuye así a la iniciación de estudios de amilasas de trigos cultivados en nuestro país. Es de interés en un posterior trabajo, discriminar

en los trazados electroforéticos las actividades alfa de las beta amilásicas, teniendo en cuenta que tanto las características de los granos de cereales como los comportamientos industriales de los productos que se pueden obtener de ellos se encuentran relacionados con las amilasas.

Resumen

Se determinó la actividad de alfa y beta amilasa en extracto de semillas de trigo maduras en diferentes estados de germinación. En semillas maduras la mayoría de la actividad fue de beta amilasa; el contenido de alfa amilasa aumentó durante la germinación, hasta el sexto día. En discos de electroforéticos en poliacrilamida con colorantes específicos se encontró dos bandas de rápido movimiento en semillas maduras y siete bandas adicionales en los extractos de plántulas germinadas.

18 de abril 1983

J. A. LUCIANI*

M. E. DUBOIS DE TRECCO*

* Docentes de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Literatura citada

1. BELLAVIA, S. L., *et al.* Alpha amylase activity of human neonate and adult saliva. *Archives of Oral Biology* 24:117-121. 1979.
2. BERBFELD, P. Amylases, alpha and beta. In Colowick, S. O. y Kaplan, N. O., eds *New York. Methods in Enzymology*. Academic Press. 1955. pp. 1-149.
3. DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II. Methods and application of human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Science* 121:404-427. 1964.
4. KENT JONES, D. W. y AMOS, A. J. The technique and the chemistry of the baking process. In *Modern Cereal Chemistry*, ed. London. Food Trade Press Ltd. 1967. pp. 270-276.
5. KRUGER, J. E. On the relationship between free and latent beta amylases in wheat. *Cereal Chemistry* 47(1):79-85. 1970.

6. KRUGER, J. E. Changes in the amylases of Hard Red Spring wheat during growth and maturation. *Cereal Chemistry* 49(4):379-390. 1972.
7. KRUGER, J. E. Change in the amylases of Hard Red Spring wheat during germination. *Cereal Chemistry* 49(4):391-398. 1972.
8. MARKERT, C. L. Isozymes. In Liss, A. R., ed. *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, New York, s.c. 1977. pp. 1-17.
9. OLERED, R. y JONSSON, G. Electrophoretic studies of alpha amylase in wheat II. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 21:385-392. 1970.
10. REED, R. y THORN, J. A. Enzymes. In Pomeranz, Y., ed. *Wheat Chemistry and Technology*. St. Paul, Minnesota. American Association of Cereal Chemistry. 1971. pp. 452-491.
11. TKACHUK, R. y KRUGER, J. E. Wheat alpha amylases. II. Physical characterization. *Cereal Chemistry* 51(4):508-529. 1974.
12. WARCHALEWSKI, J. R. y TKACHUK, R. Durum wheat alpha amylases: isolation and purification. *Cereal Chemistry* 55(2):146-156. 1978.

Plant growth and boron uptake by *Lycopersicon esculentum* and *L. cheesmanii* f. *minor*.

Resumen. Plantas de dos cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y de una especie silvestre (*L. cheesmanii* f. *minor*) fueron cultivados durante tres semanas en soluciones nutritivas con niveles de boro de 0.5 a 11 ppm para los cultivares comerciales y de 0.5 a 32 ppm, para la especie silvestre.

El peso seco de raíces de los cultivares fue menor con 2 y 3 ppm de B que a mayores o menores concentraciones de este elemento. Síntomas visuales de toxicidad de B, bordes necróticos de hojas maduras, completamente expandidas, fueron evidentes con concentraciones de 2 ó más ppm de B. Las plantas se volvieron necróticas con 11 ppm de B.