

FLUCTUACIONES DEL CONTENIDO DE AMINO ACIDOS
LIBRES DE DACTYLIS, DURANTE EL RITMO
ENDOGENO ANUAL DE GERMINACION

POR

FEDERICO KOCHER

FLUCTUACIONES DEL CONTENIDO DE AMINO ACIDOS LIBRES EN DACTYLIS,
DURANTE EL RITMO ENDOGENO ANUAL DE GERMINACION

Por

Federico Kocher G.

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas
Turrialba, Costa Rica
Junio, 1961

FLUCTUACIONES DEL CONTENIDO DE AMINO ACIDOS LIBRES EN DACTYLIS,
DURANTE EL RITMO ENDOGENO ANUAL DE GERMINACION

Tesis

Sometida al Consejo de Estudios Graduados
como requisito parcial para optar al grado

de

Magister Agriculturae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas

APROBADO:

Consejero

Comité

Comité

Comité

Junio, 1961

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar sus agradecimientos a los miembros de su Comité Consejero: Ing. Gerardo Budowski, Dr. Robin L. Cuany, Dr. Carlos E. Fernández por su asesoramiento y especialmente a su Consejero principal Dr. Howard Boroughs.

Al Dr. Jochen Kummerow, jefe del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile, a quién pertenece la idea original de este trabajo.

Al Departamento de Energía Nuclear del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas y a la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile, por haberle brindado la oportunidad de realizar estudios post graduados.

A aquellos miembros del personal del Instituto que prestaron su gentil colaboración para llevar a cabo el presente trabajo.

BIOGRAFIA

El autor nació en la ciudad de Santiago, Chile, en el año 1935.

Realizó sus estudios universitarios en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile, graduándose de Ingeniero Agrónomo en 1958.

Desde 1957 trabaja en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile.

Ingresó al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas en julio de 1960 para realizar estudios postgraduados, mediante una beca del Departamento de Energía Nuclear, egresando en junio de 1961.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
MATERIAL Y METODO.....	12
RESULTADOS	15
DISCUSION	17
RESUMEN.....	20
SUMMARY.....	22
LITERATURA CITADA	24
APENCICE.....	29

INTRODUCCION

El estudio de las variaciones de los elementos constitutivos de las semillas en relación con las respuestas de ellas a diferentes estímulos, estados de desarrollo y nutricionales, viene haciéndose desde hace numerosos años. Sin embargo el estudio de las variaciones en el contenido de amino ácidos libres, solo adquirió un relieve especial, a partir del año 1944 en que Consden, Gordon y Martin dieron comienzo a la actual técnica analítica de la cromatografía en papel (8).

En general las variaciones en el contenido de amino ácidos libres en plantas están influenciadas por numerosos factores, tales como: las deficiencias de elementos nutritivos, la hora del día, los efectos de radiaciones etc. También se han estudiado los amino ácidos en la germinación encontrándose que algunos de ellos actúan como inhibidores, mientras que otros varían de acuerdo con el estado del proceso germinativo o con inducciones fotoperiódicas.

El estudio de los ritmos endógenos (ver definición en página No. 3) se ha incrementado en los últimos años por la significación que tiene en la comprensión del comportamiento de animales y vegetales en los medios en que viven. Por los trabajos realizados se llega a la conclusión de que una mayor profundización en el mecanismo de los ritmos endógenos en las plantas, es posible solamente investigando el metabolismo de ellas.

Sabemos desde hace bastante tiempo que el reposo y la actividad de las plantas se producen al igual que en los animales, a pesar de encontrarse bajo el efecto de condiciones constantes por numerosos años.

En el año 1959 Kummerow (27) publicó un trabajo en que muestra la variación rítmica de cariopsis de Dactylis glomerata a lo largo del año.

(El Dactylis, es una gramínea de amplia difusión en las zonas templadas y tiene gran uso como forrajera). Los resultados obtenidos lo llevaron a repetir su trabajo, efectuando las mismas experiencias y con el mismo material, pero sembrado en diferentes zonas de Chile. El propósito de sembrar estos cariopsis en distintas latitudes geográficas, fué ver si el cambio de las condiciones en que las plantas se desarrollan y fructifican, producen alguna variación en el ritmo de germinación de ellos. Siendo posible de esta manera comprobar si el ritmo observado es influenciado o no por las condiciones ambientales.

El trabajo de esta tesis corresponde al estudio de las variaciones de amino ácidos libres que estos cariopsis presentan de acuerdo con las variaciones en el poder germinativo.

REVISION DE LITERATURA

RITMOS ENDOGENOS

Ritmo endógeno es el término usado para describir procesos biológicos que se presentan periódicamente a pesar de que las condiciones externas se mantengan constantes. Podemos decir que el movimiento de un péndulo es análogo con el ritmo biológico. Como en el movimiento pendular, los sistemas biológicos también solo necesitan de un impulso para ponerse en marcha.

Un impulso causado por una variación externa, como ser, el paso de la oscuridad a la luz o desde bajas a altas temperaturas, pueden provocar un ritmo endógeno que hasta ese momento era desconocido o irreconocible (4).

Muy frecuentemente estos factores externos son solo decisivos para determinar el tiempo, es decir, fijar la posición de un máximo o de un mínimo del ritmo; el cual ocurre siguiendo el impulso, siempre que las condiciones externas sean constantes. El tiempo requerido para un período del ritmo, depende sin embargo de factores externos.

Un ritmo endógeno no tiene que ser considerado necesariamente de origen hereditario, a pesar de que casi siempre lo es. En algunos casos es obviamente inducido por algún ritmo externo, como ser por ejemplo la periodicidad de la luz y la oscuridad (4).

En muchos casos un impulso tan simple como el cambio de la luz a la oscuridad o viceversa, no es suficiente para poner de manifiesto el ritmo.

Un ritmo endógeno generalmente puede ser puesto de manifiesto bajo condiciones externas constantes por un breve lapso de tiempo. Algunas veces solo dos períodos pueden ser registrados, de no continuarse los impulsos externos que los estimulan.

En las plantas superiores encontramos ritmos endógenos de períodos cortos, en relación con los que se presentan en el interior de los tejidos. Podemos mencionar por ejemplo los movimientos nutacionales de ellas. Estos se manifiestan por si mismos en la manera de crecer, especialmente en las partes apicales de los brotes; en lugar de crecer derechos se producen movimientos de rotación. En los zarcillos, estos movimientos son especialmente regulares; se producen por un crecimiento desigual del tallo. En coleóptilos de Triticum, se han observado movimientos nutacionales que alcanzan amplitudes de 5 a 8 milímetros. La duración de cada período en este caso es aproximadamente de tres horas.

Las primeras observaciones sobre la existencia de un ritmo endógeno diurno en las plantas, fueron hechas hace mucho tiempo. Investigaciones sobre los movimientos diurnos de las hojas iniciaron la idea de que un elemento endógeno estaba relacionado con ello. Hace aproximadamente 50 años fueron publicados los primeros informes sobre las variaciones diurnas y otros procesos fisiológicos. Los ritmos probaron ser, no solo endógenos, sino que también hereditarios y por lo tanto no inducidos a temprana edad en el desarrollo del individuo (4).

En un trabajo realizado por Ingold (22) en Daldinia, en condiciones de oscuridad continua, la descarga de esporas se mantuvo por 12 horas. En continua luz no se produjo descarga después de tres días. La periodicidad fué restablecida tan pronto como las plantas fueron expuestas a períodos alternados de luz y oscuridad.

Recientes trabajos llevados a cabo por Jones (23) en Callitriche y especialmente el trabajo de Bail (3) en cariopsis de avena, demuestran la participación de un ritmo endógeno en las variaciones diurnas de crecimiento.

Después del simple impulso de trasladar las semillas de una luz roja continua a completa oscuridad, se establece un ritmo diurno de crecimiento

en la oscuridad que dura de 2 a 3 días. Este hecho indica que una alteración precedente de luz y oscuridad no es necesaria para poner de manifiesto este ritmo diurno de crecimiento hereditario. Trubetskova (52), trabajando en plantas de girasol que no recibieron luz durante 9 días, observó la falta de producción de cambios en el flujo de la savia, no alterándose su ritmo diurno. Stoev (49) ha encontrado un ritmo diurno en las variaciones del contenido de azúcares y amino ácidos en la savia de la vid. Se puede concluir que los ciclos de luz y oscuridad cambian la máxima o la mínima del ritmo endógeno diurno a cualesquiera horas del día; pero la magnitud de los períodos puede ser cambiada en una extensión limitada solamente.

A pesar de que numerosos autores han estudiado la regulación de los ritmos endógenos diurnos a través de variaciones de luz y oscuridad, poco se sabe del fotoreceptor.

Los ritmos endógenos pueden ser regulados también por ciclos de altas o bajas temperaturas. Se sabe que esta influencia en las plantas superiores es de menor importancia que el de los ciclos de luz y oscuridad. En todos los casos estudiados se llega a la conclusión de que los ciclos de alta y baja temperaturas regulan los ritmos de tal modo, que la fase fisiológica que normalmente transcurre durante el período de luz, se produce en el período de alta temperatura y la que normalmente transcurre en la oscuridad, en el período de baja temperatura.

En forma similar a los ciclos de luz y oscuridad, los ciclos de temperatura tienen un efecto regulador sólo cuando la duración de un ciclo no se desvía de las 24 horas. Cuando los ciclos de temperatura se desvían en más de 24 horas, sucede lo mismo que en los ciclos de luz y oscuridad, el ritmo sigue su propio camino con períodos de 22 a 26 horas.

Muy frecuentemente en luz permanente u oscuridad permanente, la dura-

ción de un período difiere de 24 horas. Así por ejemplo se pueden medir ciclos de 26 horas; de modo que para reconocer la magnitud del componente endógeno del ritmo se debe trabajar solamente en condiciones constantes, para conseguir de esta manera que el verdadero componente endógeno del ritmo pueda mostrar su tendencia, que puede desviarse algo de las 24 horas.

Una mayor profundización en los mecanismos del ritmo endógeno solo es posible investigando el metabolismo de las plantas. En relación con esto, los trabajos efectuados por Daniel (11) en raíces de coníferas, por Grossenbacher (18) en plantas decapitadas de Helianthus que crecieron en condiciones constantes, presentando un ciclo autónomo de exudación y los efectuados por Hagan (19) que encontró que la causa de los ciclos diarios de exudación se encuentra en las raíces, son de interés.

Algunas formaciones de depósitos internos en plantas indican la existencia de variaciones diurnas en la actividad enzimática. Esto es particularmente válido en el depósito de estratos en los granos de almidón. Ha sido demostrado por Robert y Proctor (41) y también por Menge (29) que la formación de estratos se continúa aún bajo condiciones externas constantes. Más aún, Buening y Hess (5) han probado que la formación de un doble estrato ocurre en el lapso de 24 horas.

Para explicar el mecanismo del ritmo endógeno diurno Galston y Dalberg (17) consideran que el ritmo comienza con la formación de la oxidasa del ácido indol acético, la cual es atribuida a un gradual incremento en el nivel de auxina. Consecuentemente, después que ha tenido lugar una intensa formación de enzima, se produce una inactivación de la auxina y el resultado es un descenso en el nivel de esta. Las fluctuaciones diurnas de la concentración de auxina, las conectan con el ritmo endógeno diurno. Por ejemplo las hojas de Kalanchoe Blossfeldiana muestran un máximo de producción

de auxina más o menos 3 a 6 horas después del comienzo del período de luz. En completa oscuridad seguida por ciclos de luz y oscuridad, este máximo es alcanzado en 6 más 24 horas, 6 más 48 horas, etc. después del comienzo del último período de luz (17).

Se han hecho esfuerzos para explicar el mecanismo de la autoregulación fisiológica en los ritmos endógenos diurnos, desde el punto de vista del balance energético. La opinión de Buenning (4), al respecto es, que sería prematuro construir hipótesis en este momento; sin embargo agrega, es importante destacar que una fase de acumulación de energía se alterna regularmente con una fase de descarga de energía. Quizás esto suceda en todas las células vivas y de ahí que se mantengan los ritmos. En todo caso parece ser un principio fundamental en el funcionamiento de todas las células vivas.

Buhemann (6), trabajando con esporas de Oedogonium, encontró que el sistema que produce el ritmo endógeno diurno no es alterado por venenos tales como el cianuro de sodio, arseniato, 2-4 diclorofenol, fluoruro de sodio y otros. De manera que no podemos conectar el mecanismo del ritmo endógeno con la actividad de las enzimas y el sistema citocromático, que son inactivados por estas sustancias. En todos los casos, la periodicidad de los procesos fisiológicos se mantiene tanto tiempo como el veneno tarda en suprimir los procesos fisiológicos, dañando o matando las plantas.

A pesar de que el mecanismo de los ritmos endógenos no está completamente entendido, está claro por ahora, debido a la información obtenida de que dos fases, cada una de aproximadamente de 12 horas se alternan durante el transcurso del ritmo endógeno diurno. Estas fases difieren en forma cuantitativa con respecto a algunos procesos parciales y en relación a otros en forma cualitativa. Primeramente reaccionan en forma diferente a la luz que a la oscuridad. Para un desarrollo normal debe presentarse

un ritmo de luz y de oscuridad y este ritmo debe estar en el período del ritmo endógeno, es decir en un ciclo de 24 horas.

Se sabe desde hace bastante tiempo que el receso y la actividad de las plantas se produce a pesar de encontrarse bajo el efecto de condiciones constantes. Así en otoño comienza el receso de las yemas a pesar de no cambiarse las condiciones externas. Lo mismo puede decirse de la reacción primaveral. Las semillas también se comportan en la misma forma. Sin embargo en muchos casos a pesar de encontrarse en condiciones constantes por numerosos años, se producen cambios en la actividad ya sea un ascenso o descenso de ella. Esto ha sido establecido por largas observaciones en árboles en condiciones uniformes en los trópicos. En el laboratorio esto es aún más evidente; las experiencias de Henssen (21) en Spirodela, pueden señalarse como un buen ejemplo. El mantuvo plantas a 20°C bajo luz continua y en intervalos definidos de tiempo controló el número de hojas que se formaban. En el período que va desde noviembre hasta febrero, el número de hojas fué aproximadamente 100; desde mayo el número disminuyó a 0; desde julio a agosto el número subió nuevamente a 100, aquí se mantuvo el número hasta mayo cuando descendió abruptamente a 0 una vez más. Estos cambios en el grado de receso se correlacionan con cambios metabólicos y proteoplasmáticos, como fué demostrado por Pirson y Gollner (33).

Por último, muchos de estos cambios de actividad enzimática, respiración, permeabilidad, etc. son evidentemente el resultado de los cambios de actividad o pueden ser considerados fenómenos acompañantes, pero no la causa. La falta de explicaciones se vuelve particularmente evidente cuando consideramos semillas secas al aire, guardadas en condiciones constantes que muestran variaciones en sus capacidades germinativas en muestras ensayadas en diferentes épocas del año, como lo ha demostrado Kummerow (27) en Dactylis glomerata.

VARIACIONES DE LOS AMINO ACIDOS EN PLANTAS

El estudio de las variaciones de los elementos constitutivos de las plantas en relación con las respuestas de ellas a diferentes estímulos, estados de desarrollo y nutricionales, viene efectuándose desde hace numerosos años. Asen (2), trabajando en Hydrangea, encontró que el efecto de las temperaturas bajas utilizadas para romper la latencia, alteraba la concentración de los amino ácidos libres, tanto en las hojas como en los brotes terminales. Levitt (28) en trabajos efectuados en papas encontró que cuando las papas salen del período de latencia se produce un incremento en el contenido de las proteínas totales en los tubérculos. Scarcia (43) ha encontrado que las semillas de tabaco al envejecer, presentan variaciones en su contenido de amino ácidos tanto en cantidad como en calidad. Vallance (54) en semillas de Rhinantus Crista-galli, encontró que el factor que controla su germinación se encuentra en la naturaleza y proporción del hidrolizado de las proteínas de reserva.

Pleshkov y Shmyreva (35), analizando amino ácidos libres en maíz, encontraron que estos no permanecen constantes durante el crecimiento de la planta. Las mayores variaciones las presentaron los amino ácidos, ácido aspártico y glutámico, alanina, serina y glicina. En trabajos con frijoles (36) se presentaron incrementos en el contenido de amino ácidos en las plantas deficientes en P y K.

Stoiev (49), trabajando con los azúcares y amino ácidos libres de la savia de vides, encontró un ritmo diario de estos compuestos, presentándose un máximo de concentración a las 2 p.m. y un descenso en la noche. Una observación similar efectuó Van Die (53) trabajando en el xilema de tomates, encontrando un máximo entre las 11 a.m. y la 1 p.m.; el mínimo se presentó en la noche. Mokronosov (31) señala la presencia de este ritmo de amino ácidos en papas.

Stokes (50), en experiencias realizadas con Heracleum Sphondylium, observó que a 50°C se aceleraba la formación de amino ácidos libres a partir de las proteínas del endosperma. También se produjo la acumulación de arginina y glicina; amino ácidos que favorecieron el crecimiento de los embriones, pero al acumularse alanina se produjo un efecto contrario.

Nuccorini (32) ha observado que la glutamina presente en las semillas tiene mucho que ver con el metabolismo de la germinación.

Fine y Barton (14), estudiando latencia y maduración de semillas a temperaturas de 50°C y en invernadero, encontraron variaciones de amino ácidos libres de estas; a bajas temperaturas tenían mayores cantidades de ácido glutámico y valina. En el endosperma de las semillas a 50°C, se encontró mayores cantidades de serina y glicina que en las del invernadero.

Coleman (7), estudiando efectos del azufre en el contenido de amino ácidos libres en Trifolium, señala que la arginina se presentó en mayores cantidades y que el ácido glutámico descendió con la falta de este elemento. Trabajos efectuados con Cl por ⁺reney (16) con hojas cloróticas por de Koch (12) y con N, P, K, por Satarova (42), indican que los amino ácidos experimentan grandes variaciones según sea el elemento o la planta estudiada.

Los rayos gamma han mostrado tener efecto en el contenido de amino ácidos libres. Hagen y Gunckel (20) en trabajos efectuados en plantas de Nicotiana, señalan que cuando estas presentan anomalías a causa de las radiaciones, se acumulan los amino ácidos libres.

Kojima (26), estudiando las variaciones en el contenido de amino ácidos libres en plantas de arroz y trigo observó que estos se acumulan hasta el momento de germinar. Una vez producida la germinación desaparecen algunos como la alanina, leucina y tirosina. Relaciona este hecho con el

consumo de amino ácidos libres que efectúa el embrión para construir nuevos tejidos.

Steward y colaboradores (48) determinaron que en los tejidos en crecimiento el contenido de amino ácidos libres es menor especialmente en asparagina, glutamina y arginina.

Anders y Venter (1), trabajando en tumores de plantas de Nicotiana, piensan que estos se deben a la presencia de cantidades anormalmente altas de amino ácidos libres. Montant (30) también encontró modificaciones en el metabolismo de amino ácidos libres en plantas enfermas.

Cotrufo (9) y Cotrufo y Levitt (10) han encontrado una relación entre el contenido de asparagina y glutamina y el término de la latencia en papas; cuando se termina aumentan estos.

Szalai (51) y Satarova (42), han encontrado que en papas que comienzan a germinar, el contenido de amino ácidos libres sube hasta que las yemas inician su crecimiento, de ahí en adelante baja el contenido.

Folkes y Yemm (15) señalan que la avena al germinar disminuye su contenido en ácido glutámico y prolina, mientras que aumentan el ácido aspártico, alanina, glicina, lisina y arginina.

Kazaryan (24) estableció, trabajando en Perilla ocymoides, una relación entre un alto contenido de amino ácidos libres en las hojas y la floración. Un bajo contenido de ellos sintetizados en las hojas, favorece el crecimiento vegetativo de la planta.

Rijven (40), cultivando in vitro embriones de plantas, encontró que la glutamina y asparagina incrementaban el crecimiento hasta cierta concentración y que después se transformaban en inhibidores.

MATERIALES Y METODOS

CARIOPSIS

Los cariopsis de Dactylis glomerata, pertenecen a la variedad "Neozelandia". Kummerow (27) en el período 1958-59, demostró que estos cariopsis muestran en condiciones apropiadas un ritmo de germinación anual. Este mismo material se sembró para este experimento en las siguientes localidades y latitudes de Chile: Vallenar 28°S, Serena 30°S, Rincónada 33°S, Curicó 35°S, Chillán 36°S, Los Angeles 37°S, Valdivia 39°S y Osorno 40°S. Se tomaron 5 gr de cariopsis de cada zona y se guardaron en tubos de ensayo sellados y en la oscuridad a 2 temperaturas: 5°C y 25°C. A este material se le hicieron determinaciones mensuales de germinación en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Escuela de Agronomía de la Universidad de Chile y de amino ácidos libres en el laboratorio del Departamento de Energía Nuclear del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Turrialba, Costa Rica.

Las muestras analizadas corresponden a las siguientes localidades y condiciones de almacenamiento: Vallenar 5°C y 25°C, Serena 25°C, Rincónada 5°C y 25°C, Curicó 25°C, Chillán 5°C y 25°C, Los Angeles 25°C, Valdivia 25°C y Osorno 5°C y 25°C. Los cariopsis para el análisis de amino ácidos fueron enviados mensualmente desde Chile envueltos en bolsas de polietileno. Se trabajó con las muestras correspondientes a los meses de noviembre, diciembre, enero, febrero y marzo.

PREPARACION DEL EXTRACTO

Mensualmente se prepararon extractos de los amino ácidos libres presentes en las muestras de las diferentes zonas. La extracción de los amino ácidos de los cariopsis se hizo en la siguiente forma:

a) se les eliminó las glumelas mediante frotación con un tapón de hule contra un tamiz de 2mm. A continuación se hizo una separación manual de las glumas y cariopsis. De estos cariopsis se pesó 500 mg para efectuar la extracción.

b) se molieron las muestras en un mortero de porcelana, utilizando 5 ml de etanol 80%, hasta convertirlos en una pasta muy fina. Se pasó este material a vasos de precipitado lavando cuidadosamente con 15 ml de etanol 80% y se le dejó reposar durante 12 horas a 4°C.

c) se procedió luego al arrastre de los amino ácidos contenidos en la muestra, para ello se utilizó un embudo Buchner con papel filtro Whatman No. 1 y un Kitasato conectado a una trompa de agua. Se le hizo pasar etanol 80% hasta completar 125 ml.

d) se purificó el extracto de su contenido en cationes pasándolo por una columna de resina Dowex de H⁺ 50x12, de malla 100-200, embebida en etanol 80% y en un tubo de 1 cm de diametro y 30 cm de alto con 6,5 cm de resina. El flujo de paso del líquido se reguló en 3 ml por minuto. Los amino ácidos retenidos en la columna fueron extraídos lavando con las siguientes soluciones: 1) 25 ml de NH₄OH 0,4 N en etanol 80%, 2) 15 ml de etanol 80%, 3) 15 ml de agua bidestilada, 4) 15 ml de NH₄OH 4 N y 5) 15 ml de agua bidestilada, de acuerdo con el método propuesto por Plaisted (34). La solución resultante fué evaporada a sequedad utilizando un evaporador rotatorio Rinco a una temperatura inferior a 40°C. Tan pronto como el extracto se secó se lavó cuidadosamente el frasco de vacío con 4,5 ml de una mezcla de acetona agua 1:1 (v/v) y se pusieron en el refrigerador a -18°C (14,55).

Este extracto se puso en matraces aforados de 5 ml y se tomó un ml de cada muestra; éste se concentró al vacío a 40°C hasta aproximadamente 50 micro litros para hacer los cromatogramas semi cuantitativos.

CROMATOGRAFIA

La determinación semi cuantitativa fué hecha trabajando en cromatografía papel unidimensional descendente.

Se aplicaron los 50 micro litros a tiras de papel Whatman No. 1 de 67 cm de largo, que permitió obtener un frente para el solvente de 59 cm. El solvente usado fué butanol normal, ácido acético y agua (4-1-1-), haciéndolo pasar tres veces por el papel. Las cámaras se saturaron con el mismo solvente y los papeles fueron secados cuidadosamente en una campana extractora a la temperatura ambiente, antes de volver a hacer la siguiente pasada. Este método permitió separar los siguientes amino ácidos: cistina, lisina-histidina, arginina, ácido aspártico-serina, ácido glutámico-treonina, alanina, prolina, tirosina, valina-metionina, triptófano, fenilalanina, leucina-isoleucina. Los pares no son separables por esta técnica. -

Después de asperjar ninhidrina 0,2% disuelta en etanol 95%, los colores se desarrollaron en una atmósfera saturada de etanol a 60°C por 30 minutos.

Las manchas coloreadas correspondientes a los diferentes amino ácidos se cortaron del cromatograma y se dividieron en trozos de más o menos 1 mm². Se les extrajo el color remojando los trozos de papel con un tampón de fosfato 0,025 M (pH 7) (14). La densidad óptica fué determinada en un espectrofotómetro Beckman modelo B, después de 15-18 horas de remojo (14).

Las lecturas para todos los amino ácidos se hicieron a una longitud de onda de 570 milimicrones, con excepción de la prolina que se leyó con una longitud de onda de 450 milimicrones. Se hicieron cromatogramas duplicados para cada extracto. Las diferencias en las cantidades de amino ácidos presentes en los extractos se determinó, comparando sus densidades ópticas multiplicadas por 1000. La máxima diferencia entre los valores de la repetición encontrada fué de 5; Los valores puestos en la tabla No. 2 representan el promedio de los dos cromatogramas.

RESULTADOS

El trabajo efectuado por Kummerow en la Universidad de Chile sobre germinación de los cariopsis de Dactylis glomerata, dió como resultado la manifestación de un ritmo de germinación con un marcado descenso en la capacidad germinativa en el mes de febrero de 1961 y una recuperación en el mes de marzo. Esto se produjo tanto en los cariopsis mantenidos a 5°C como en los a 25°C y en todas las localidades, observándose algunas variaciones en la intensidad. Los mayores descensos en la capacidad germinativa se produjeron en los cariopsis mantenidos a 5°C (ver cuadro N°1).

Los análisis de los amino ácidos libres efectuados muestran una gran variabilidad, tanto en cantidad como en calidad de ellos en los diferentes meses, como puede verse en la tabla N°1 y en los cuadros N° 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, en el apéndice.

Se destaca nítidamente una gran variación en el mes de febrero en todas las muestras analizadas.

Al no encontrarse una relación entre las variaciones en el contenido total de amino ácidos y las fluctuaciones en la capacidad de germinación de los cariopsis, se estudió la relación que los diferentes amino ácidos, expresados en porcentaje del total de cada muestra, podían tener con la germinación. Como puede verse en los cuadros N° 2C, 3C, 4C, 5C y 2A,3A, 4A,5A, se presentan las siguientes relaciones en las muestras tratadas a 5°C: y el poder de germinación: El ácido glutámico+treonina, el ácido aspártico+serina y valina aumentan su proporción en el mes de febrero y luego descienden. Los amino ácidos tirosina, alanina y lisina+histidina descienden en el mes de febrero y luego aumentan su proporción (ver cuadros N° 2B, 3B, 4B, y 5B). Si bien es cierto que las muestras tratadas a 25°C no presentaron en el mes de febrero las mismas características que las tratadas a 5°C, se hace bien notorio que los amino ácidos

aspártico+serina y ácido glutámico+treonina aumentan su proporción su proporción en este mes (ver tabla Nº 2).

Los otros amino ácidos como puede verse en la tabla Nº 2 no presentan una tendencia bien definida. No se encontró ninguna relación entre el contenido de amino ácidos libres y las situaciones geográficas en que fueron cosechados los cariopsis.

Tabla No. 1

Amino ácidos Libres totales expresados en densidad óptica multiplicada por 1000

	Rinco nada 500	Rinco nada 2500	Osoj no 500	Osoj no 2500	Chi-lán 500	Chi-lán 2500	Valle nar 500	Valle nar 2500	Valdi via 2500	Curi có 2500	Sere na 2500	Los Angeles 2500
Cistina	10	5	10	5	15	17,5	12,5	5	5	15	5	5
	7,5	7,5	5	5	15	10	5	5	5	25	5	5
	5	5	5	25	17,5	12,5	35	5	5	17,5	5	5
	22,5	5	5	5	20	22,5	5	5	7,5	7,5	10	5
	5	5	5	5	15	25	7,5	5	5	7,5	7,5	5
Iasina-histidina	30	62,5	55	42,5	35	40	5	5	17,5	27,5	22,5	30
	17,5	40	15	15	37,5	30	37,5	32,5	17,5	45	47,5	65
	25	37,5	5	90	27,5	27,5	62,5	22,5	5	27,5	50	152,5
	65	-	-	60	20	35	-	7,5	25	-	45	40
	35	47,5	5	30	22,5	37,5	42,5	5	87,5	35	45	40
Arginina	5	5	5	5	47,5	15	15	5	5	12,5	5	5
	5	7,5	5	5	35	10	5	5	10	30	5	7,5
	5	5	5	20	25	10	22,5	7,5	5	20	5	5
	20	5	-	5	45	40	-	5	7,5	-	15	5
	5	7,5	-	5	32,5	17,5	12,5	5	40	17,5	5	5
Desconocido	50	72,5	30	15	45	42,5	37,5	5	12,5	52,5	5	30
	25	47,5	35	7,5	57,5	30	35	12,5	20	57,5	52,5	45
	25	45	5	60	17,5	27,5	40	17,5	37,5	7,5	5	62,5
	150	5	5	65	75	77,5	7,5	17,5	10	7,5	30	32,5
	35	40	5	15	55	35	15	5	5	37,5	5	5
Ac. aspártico-serina	32,5	37,5	5	5	32,5	37,5	32,5	5	5	37,5	5	40
	7,5	5	5	5	27,5	15	20	5	17,5	25	5	12,5
	12,5	12,5	5	20	10	17,5	47,5	7,5	37,5	15	-	45
	150	5	5	35	55	65	7,5	10	5	22,5	5	12,5
	7,5	7,5	5	5	15	17,5	5	5	5	17,5	5	5
Glicina	112,5	210	130	117,5	110	112,5	95	40	32,5	115	150	160
	35	35	72,5	25	75	67,5	62,5	17,5	45	67,5	12,5	132,5
	35	72,5	5	200	47,5	87,5	112,5	17,5	60	15	35	125
	315	22,5	5	260	177,5	210	15	22,5	30	-	15	95
	42,5	75	5	60	62,5	60	52,5	22,5	22,5	55	15	55

Continuación Tabla No. 1

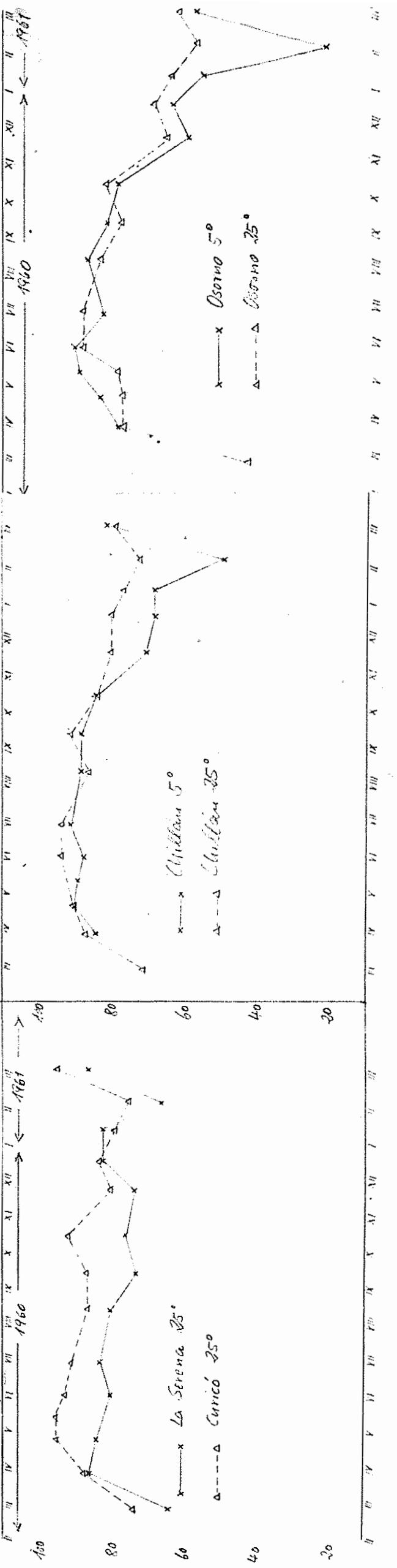
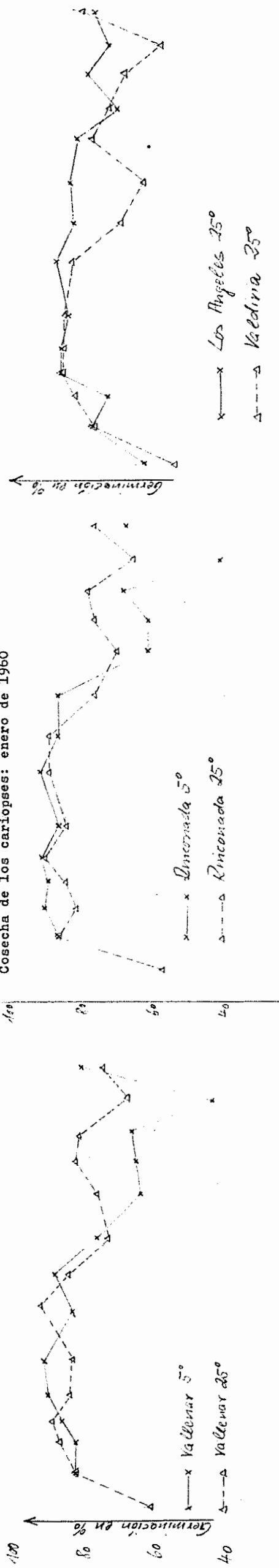
	Rinco nada 500	Rinco nada 2500	Osoy no 500	Osoy no 2500	Chi. llán 500	Chi. llán 2500	Valle nar 500	Valle nar 2500	Valdi via 2500	Curi có 2500	Sere na 2500	Los An geles 2500
Valina=	5	5	5	5	5	5	5	5	5	22,5	5	20
	5	5	5	5	10	5	5	5	5	7,5	-	5
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	-	5
	95	5	5	65	100	5	5	5	5	-	-	5
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	5
Fenilalanina	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-
	5	5	5	5	17,5	32,5	5	5	5	-	-	-
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-
Leucina-isoleucina	5	5	5	5	10	5	5	5	5	35	5	20
	5	5	5	5	17,5	10	10	5	5	12,5	-	-
	5	5	5	5	17,5	5	5	5	5	10	-	5
	57,5	5	5	50	47,5	37,5	5	5	5	-	-	5
	5	5	5	5	7,5	5	5	5	5	-	-	5

Continuación de Tabla No. 2

Valina- nacionina	Rinco nada 50C	1,7	Rinco nada 250C	0,9	Osoy no 50C	2,9	Osoy no 250C	2,1	Chil-lán 50C	1,3	Chil-lán 250C	1,3	Valle nar 50C	1,9	Valle nar 250C	5	Valdi via 250C	4,8	Curi có 250C	4,8	Sere na 250C	1,5	Los An-geles 250C	4,2	noviembre	
		3,7		2,9		2,9		5,4		3,4		3,4		2		4,8		3,7		2,1		-	1,5	1,5	diciembre	
		3,5		2,3		9		1		2,2		1,6		1,2		3,9		2,8		6,3		-	-	1,4	1,4	enero
		7,4		9,5		14,2		8,4		6,2		10,8		9,5		-		4,5		-		-	-	2	2	febrero
		2,8		2,1		9		3,3		1,5		1,9		4,2		-		2,5		-		-	-	-	-	marzo
Fenilalanina		1,7		0,9		1,7		-		-	-	-	-	-	5		-		-	-	-	-	-	-	noviembre	
		3,7		-		-		-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	diciembre	
		-		2,3		-		-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	enero	
		0,3		-		-		0,6		1,9		2,4		-		-		-	-	-	-	-	-	-	febrero	
		-		-		-		-	-	-	-	-	-	-	2,5			-	-	-	-	-	-	-	-	marzo
Leucina- isoleucina		1,7		0,9		1,7		2,1		2,6		1,3		1,9		5		-		7,5		1,5	4,2	4,2	noviembre	
		3,7		-		2,9		5,4		4,7		3,4		4		-		-		3,5		-	-	-	diciembre	
		3,5		2,3		9		1		7,7		1,6		1,2		-		-		6,3		-	-	1,4	1,4	enero
		3,7		-		14,2		6,4		5,3		2,4		9,5		-		-		-		-	-	2	2	febrero
		2,8		2,1		9		3,3		2,3		1,9		4,2		-		2,5		-		-	-	-	-	marzo

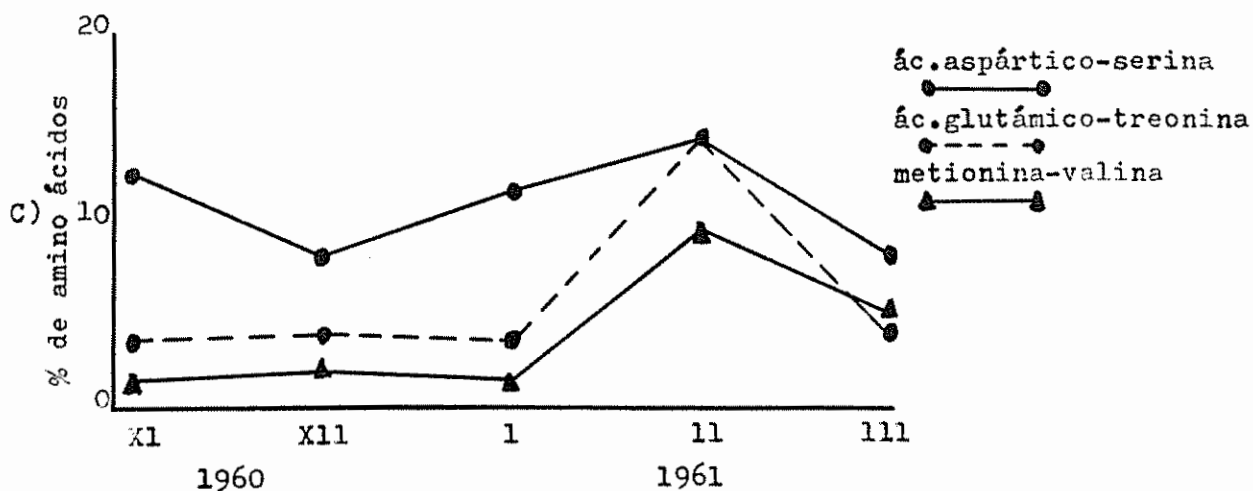
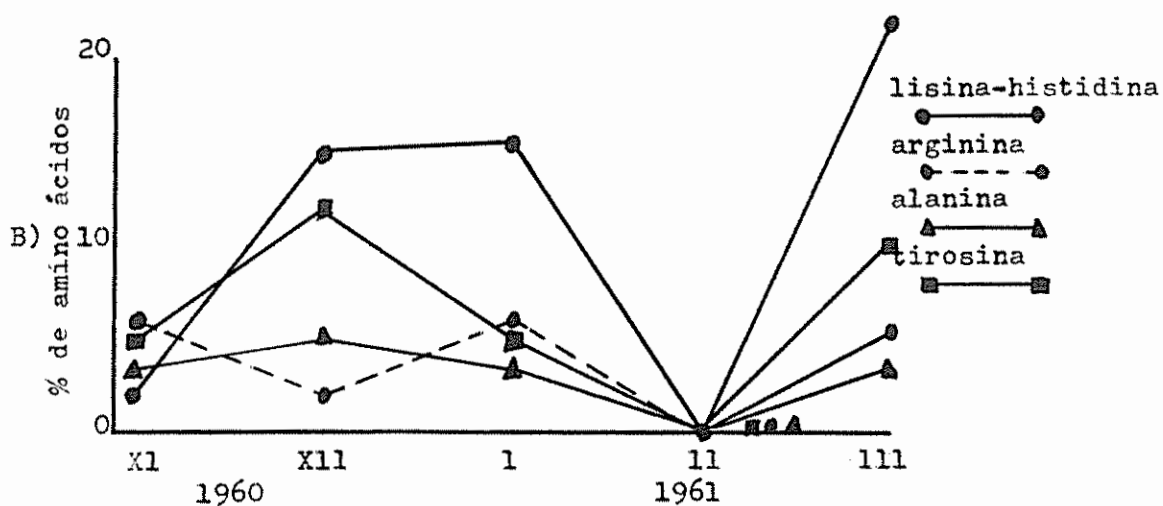
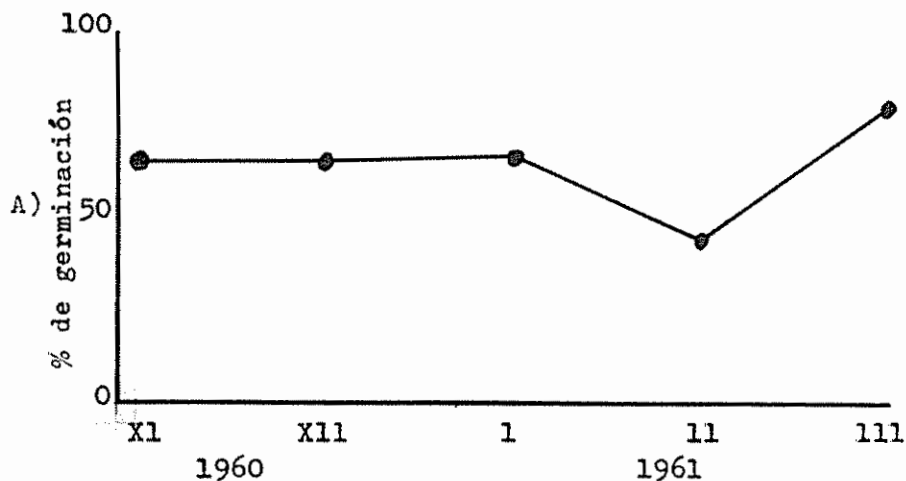
Cuadro N°1

Cosecha de los cariposes: enero de 1960



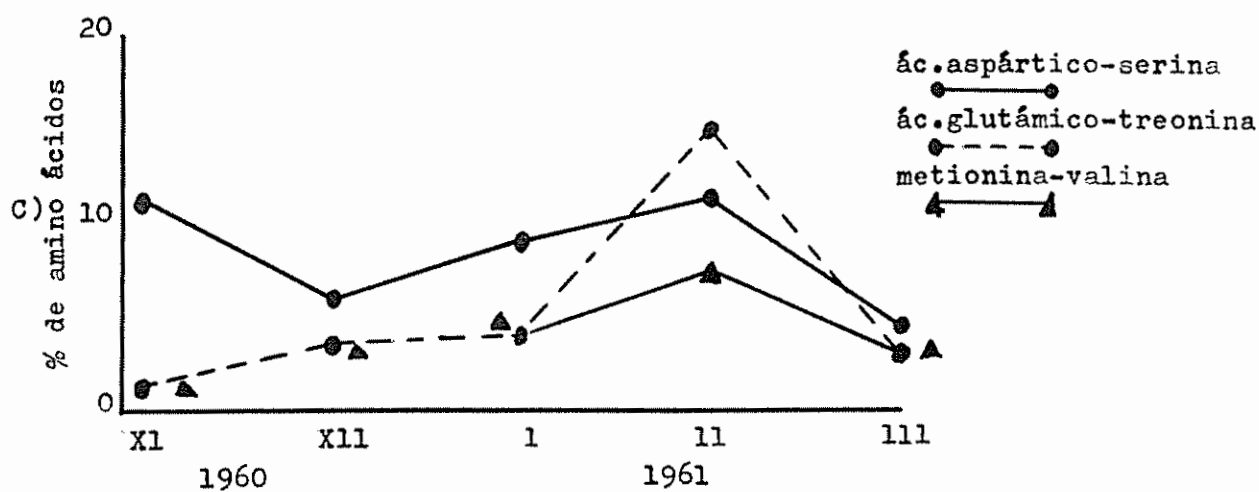
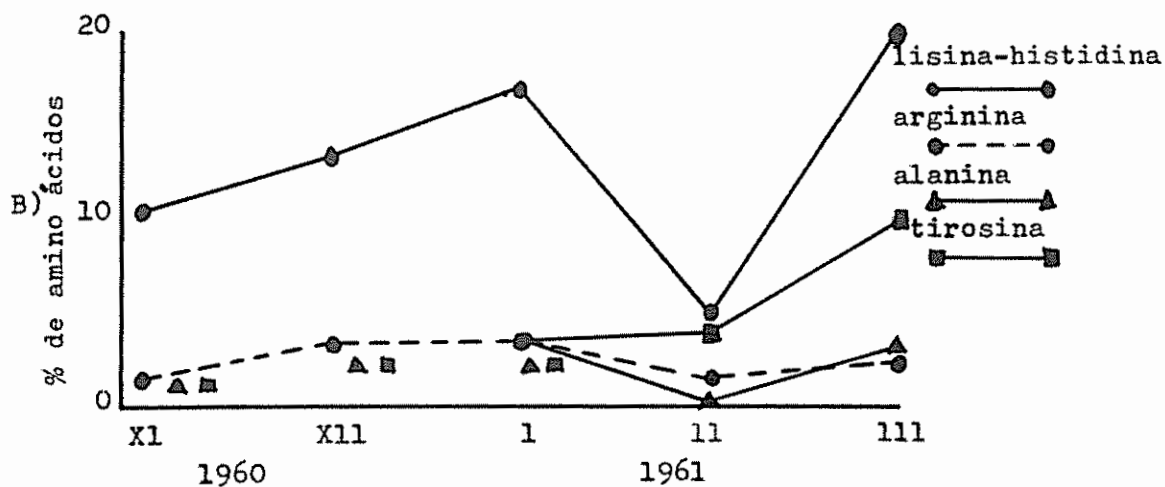
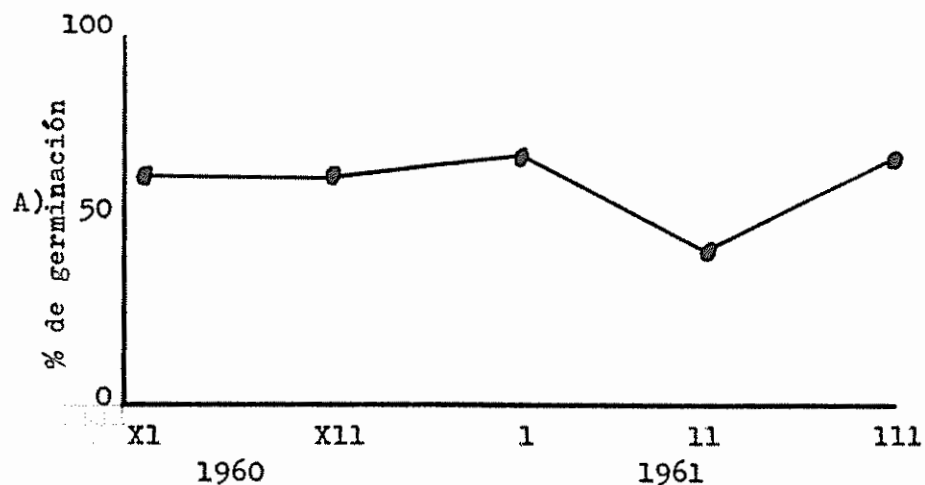
Cuadro Nº 2

Variaciones en la germinación y el contenido de :lisina-histidina
 arginina,alanina,tirosina,ác.aspártico-serina,ác.glutámico-treonina
 y metionina-valina en cariopses de Dactylis glomerata,mantenidos
 a 50C. Cosechados en Vallendar



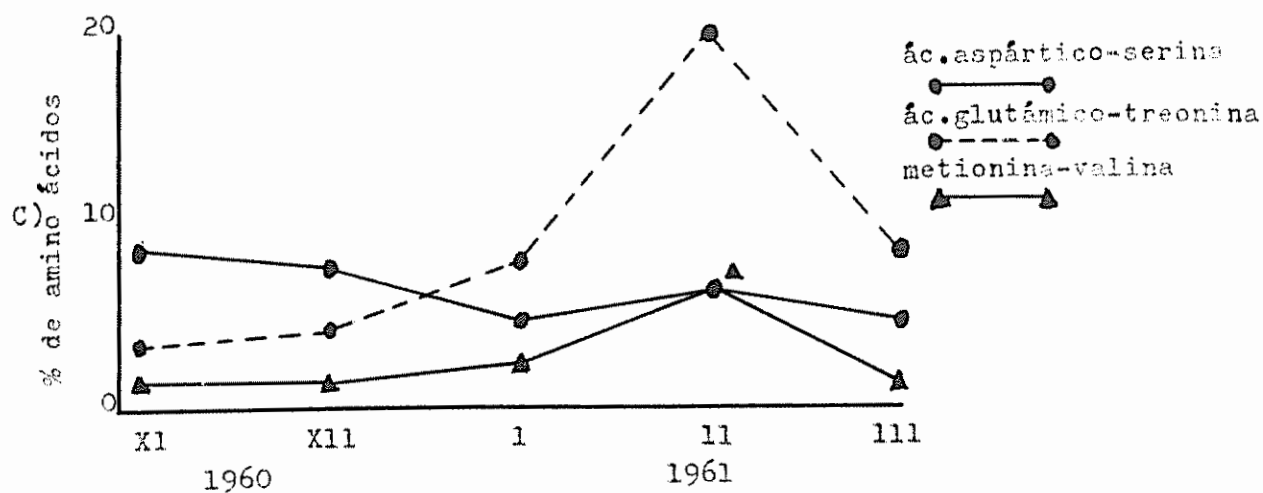
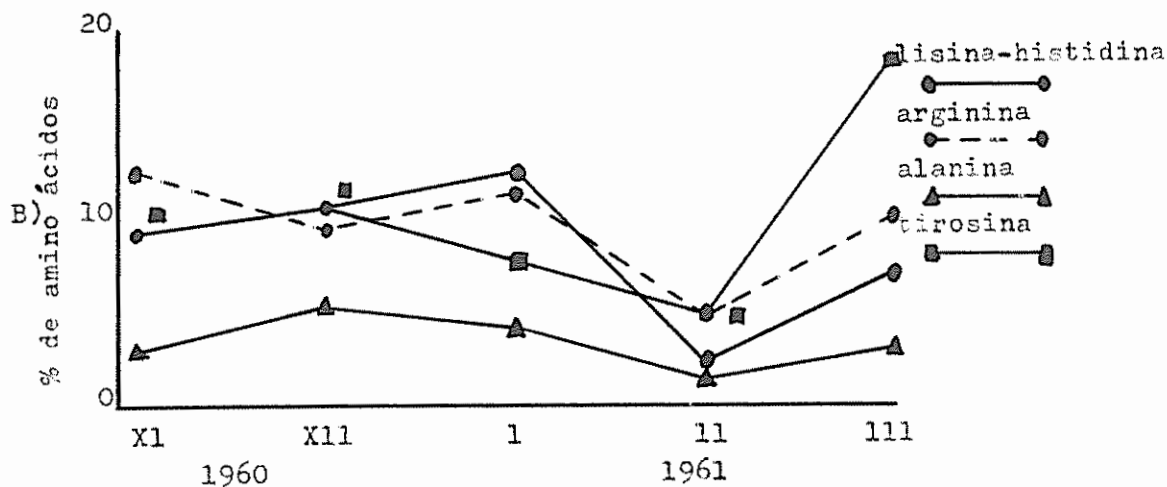
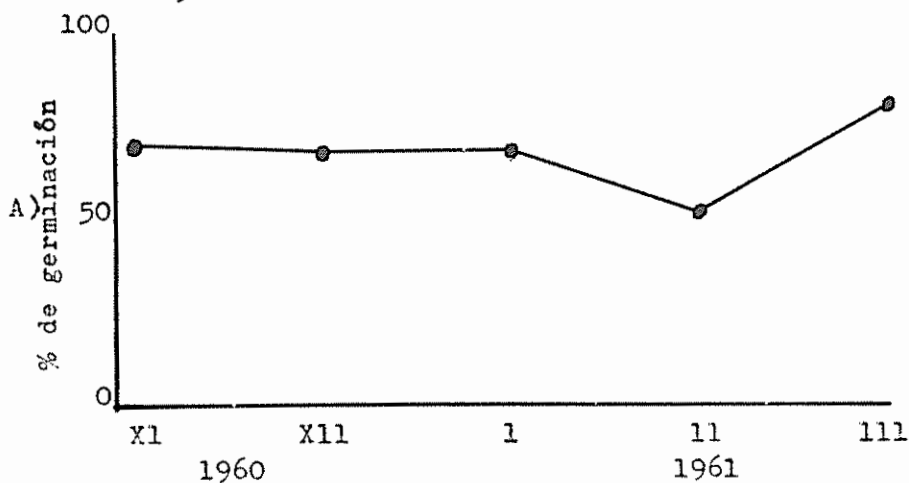
Cuadro Nº 3

Variaciones en la germinación y el contenido de: lisina-histidina, arginina, alanina, tirosina, ác. aspártico-serina, ác. glutámico-treonina y metionina-valina en cariopses de *Dactylis glomerata*, mantenidos a 50C. Cosechados en Rinconada.



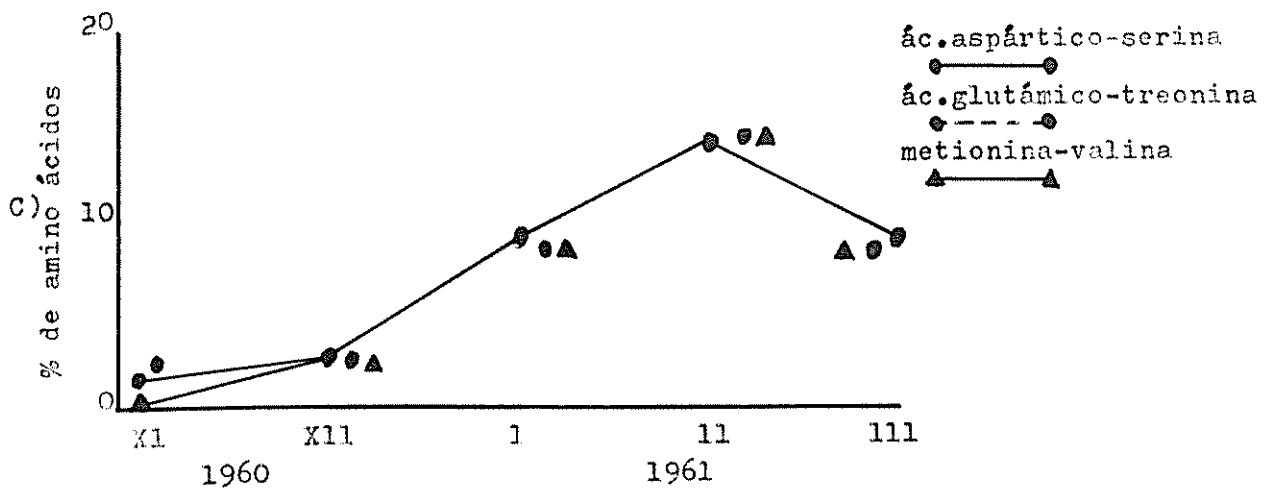
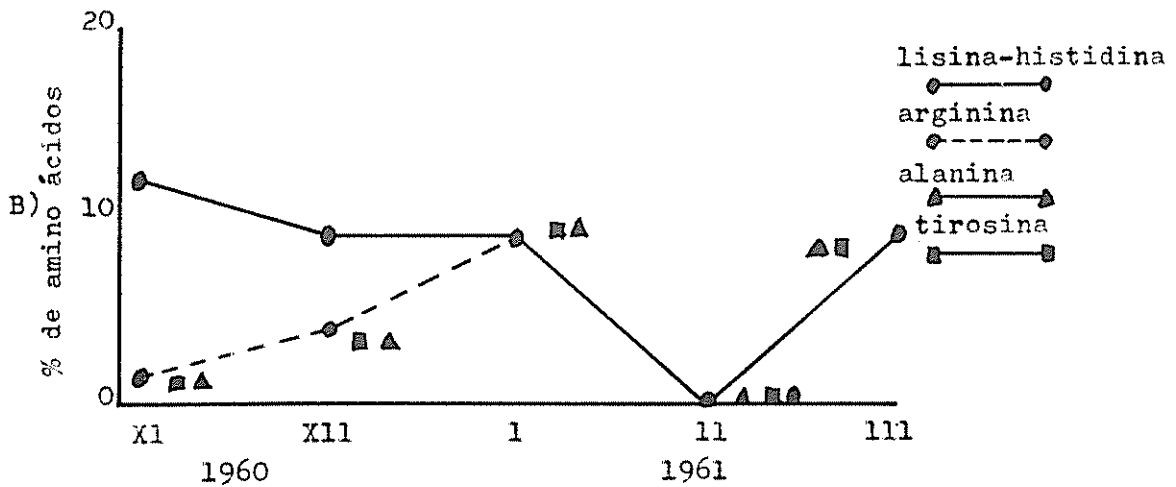
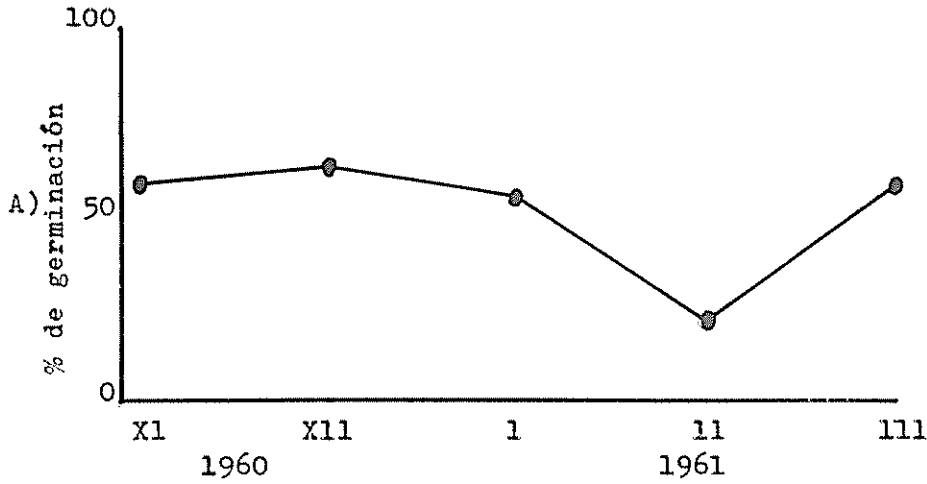
Cuadro Nº 4

Variaciones en la germinación y el contenido de: lisina-histidina, arginina, alanina, tirosina, ác. aspártico-serina, ác. glutámico-treonina y metionina-valina en cariopses de Dactylis glomerata, mantenidos a 5°C. Cosechados en Chillan.



Cuadro No 5

Variaciones en la germinación y el contenido de: lisina-histidina, arginina, alanina, tirosina, ác. aspártico-serina, ác. glutámico-treonina y metionina-valina en cariopses de actylis glomerata, mantenidos a 50C, Cosechados en Osorno



DISCUSION

La importancia del metabolismo del nitrógeno ha sido enfatizada por la publicación de tres revisiones más o menos recientes (46, 56, 57). En la efectuada por Yemm y Folkes (57) los autores indican que no existe consenso unánime en aceptar los amino ácidos como precursores directos de las proteínas de las plantas. Ellos aceptan sin embargo que los estudios de la asimilación del nitrógeno orgánico por las células vegetales y el estudio de sus propiedades enzimáticas han reforzado la posición del ácido glutámico como el principal producto primario en la síntesis de amino ácidos. El metabolismo posterior de los productos primarios de la asimilación del nitrógeno se considera que involucra una interconversión de amino ácidos, ya sea por transaminación o interconversión de estructuras carbónicas que dan por resultado los numerosos amino ácidos comunmente encontrados en los tejidos vegetales,

El metabolismo del nitrógeno envuelto en el proceso de post-maduración en embriones latentes, en el que ocurren los cambios necesarios para una subsecuente maduración, na ha sido dilucidado hasta el presente. Igual cosa sucede con el estudio de los cambios que se producen en los ritmos. Sin embargo se encuentra literatura que trata de los cambios bioquímicos que envuelven compuestos nitrogenados en la germinación de semillas. Folkes y Yemm (15) encontraron que el endosperma del grano de avena era capaz de suplir tres cuartos del total de amino ácidos requeridos por el embrión en germinación, y las cantidades sugieren que los amino ácidos son transportados al embrión y metabolizados allí.

Gran número de interconversiones de amino ácidos acompañan la síntesis de las nuevas proteínas en el embrión a expensas de las proteínas almacenadas en el endosperma. Entre los amino ácidos que estos autores encontraron incrementados durante la germinación de la avena estaban el

ácido aspártico, lisina, alanina y arginina. Al mismo tiempo se produjo un gran descenso en las cantidades de ácido glutámico y prolina. Los ácidos aspártico y glutámico y sus amidas aparecen en grandes cantidades en la germinación de trigo y arroz de acuerdo con Kojima (26). Muccorine (32) encontró que la glutamina estaba presente en menores cantidades que el ácido glutámico en cariopsis de trigo sucediendo lo contrario con la asparagina.

En nuestro experimento hemos observado una marcada acumulación de glicina, en algunos casos representando el 40% del total de amino ácidos libres. Su variación, sin embargo, no corresponde a ninguna relación bien definida. Al mismo tiempo se ha presentado en el mes de febrero, que es la fecha en la que los cariopsis tienen su mínima capacidad de germinación un descenso en el porcentaje de ácido glutámico+treonina, ácido aspártico+serina y valina, con un descenso en el mes de marzo en el que desciende la capacidad germinativa. Se observa también en el mes de febrero un descenso en los amino ácidos libres: alanina, tirosina, histidina y arginina, con un ascenso en el mes de marzo.

Steward et al (48) han encontrado que cuando se están sintetizando nuevas proteínas la mayoría de los amino ácidos descienden en cantidad, en contraste con los ácidos glutámico y aspártico que suben; situación que se parece algo a la nuestra. Según Krisman (25) el amonio fijado como grupos amino en los amino ácidos ác. glutámico y aspártico es asequible para la síntesis de otros amino ácidos a través de la reacción de transaminación, en la cual el ácido glutámico y el ácido pirúvico producen alanina. En nuestros cariopsis cuando se disminuyó la germinación descendió la proporción de alanina además de la tirosina e histidina+lisina, lo que podría estar indicando que este proceso de transaminación está bloqueado.

CONCLUSIONES

1. Las variaciones de amino ácidos libres totales, no mostraron ninguna relación con el ritmo de germinación de los cariopsis.
2. Los porcentajes de los amino ácidos libres individuales, en relación con el total de la muestra, presentaron tendencias a variar en el mes de febrero, que corresponde al mes en que los cariopsis bajan su poder germinativo.
3. Los ácidos glutámico+treonina y aspártico+serina presentaron un aumento en el mes de febrero tanto en las muestras a 50C como en las a 250C.
4. Las muestras a 50C presentaron en el mes de febrero un descenso en los amino ácidos arginina, tirosina, alanina, lisina+histidina. En el mes de marzo subieron.

Después de terminado este experimento, las sugerencias que se podrían hacer conociendo sus resultados son:

- a) repetirlo con una mayor cantidad de cariopsis de un mismo lugar, de modo que se puedan hacer 5 repeticiones del proceso extractivo por fecha.
- b) sería también interesante efectuar los análisis mensualmente a lo largo del año; ésto sólo con las muestras almacenadas a 50C que son las que aparentemente responden mejor.
- c) en el período crítico que va desde enero hasta marzo, efectuar los análisis cada 15 días.
- d) analizar las aminos glutamina y asparagina.
- e) efectuar análisis del hidrolizado de las proteínas de los cariopsis para ver si varía su composición con el ritmo de germinación.
- f) analizar el ácido pírúvico en los meses de enero, febrero y marzo.

RESUMEN

Se realizó un estudio de los amino ácidos libres presentes en cariopsis de Dactylis glomerata, variedad "Neozelandia" que habían sido mantenidos en cápsulas de vidrio selladas, en la oscuridad y a dos temperaturas 50C y 250C. Estos cariopsis provenían de un estudio del ritmo endógeno de germinación que ellos presentan en las condiciones señaladas.

El análisis de amino ácidos libres se hizo utilizando cromatografía papel, unidimensional descendente, con butanol normal, ácido acético y agua (4-1-1) como solventes. Los cromatogramas fueron desarrollados con ninhidrina 0,2% y las manchas disueltas en una mezcla tampón de fosfato para determinar su concentración en un espectrofotómetro.

Se encontró una gran variación en el contenido mensual de amino ácidos libres totales en las diferentes muestras, no observándose relación entre ellas y las fluctuaciones en la capacidad germinativa, influenciada por el ritmo.

Las conclusiones obtenidas son las siguientes:

1. Las variaciones de amino ácidos libres totales, ~~no~~ mostraron ninguna relación con el ritmo de germinación de los cariopsis.
2. Los porcentajes de los amino ácidos libres individuales, en relación con el total de la muestra, presentaron tendencias a variar en el mes de febrero, que corresponde al mes en que los cariopsis bajan su poder germinativo.
3. Los ácidos glutámico+treonina y aspártico+serina presentaron un aumento en el mes de febrero tanto en las muestras a 50C como en las a 250C.
4. Las muestras a 50C presentaron en el mes de febrero un descenso en los amino ácidos arginina, tórosina, alanina, lisina+histidina. En el

mes de marzo subieron.

Se discute la posibilidad de que las fluctuaciones en el mes de febrero se deban a que se esté produciendo una activa formación de proteínas estando indicado este fenómeno por la acumulación de ácido aspártico+serina y ácido glutámico+treonina en dicho mes.

SUMMARY

The free amino acid content of caryopses of Dactylis glomerata (var. New Zealand) were studied as a function of the endogenous rhythm of germination. The caryopses were obtained from 8 regions in Chile and were stored in sealed glass ampoules at 5°C and 25°C.

The analysis of free amino acids was made using one dimensional descending paper chromatography, with normal butanol, acetic acid and water (4-1-1) as solvent. The chromatograms were developed with 0,2% ninhydrin, and the spots dissolved in a phosphate buffer solution. The amino acid concentration was determined with a spectrophotometer.

A great variation in the monthly content of the total free amino acids was found, but there was no relation between the concentration and the fluctuations of the germinative capacity.

There was an increase in the percentage of aspartic acid + serine, and glutamic acid + threonine, in samples stored at both 5°C and 25°C when germination was least (February). The percentage of methionine + valine increased only in samples stored at 5°C. As germination capacity increased, the percentage of these amino acid pairs decreased.

In samples stored at 5°C, the following amino acids decreased in February:

lysine + histidine, alanine, arginine and tyrosine, but increased beginning in March.

The possibility that the fluctuations in February are due to a

formation of proteins was discussed. This phenomenon is indicated by an increase in concentration of aspartic+serine and glutamic+threonine.

LITERATURA CITADA

1. ANDERS, F. & VENTER, F. Genetic condition of tumors and the content of free amino acids in Nicotiana. *Experientia* 16: 65-67. 1960. Original not available for examination; abstracted in *Biological Abstracts* 35: 56875. 1960.
2. ASEN, S. & STUART, N.W. Effect of low temperature on the free amino acids of dormant Hydrangea macrophylla as revealed by paper chromatography. *American Society for Horticultural Sciences, Proceedings* 71: 563-567. 1958.
3. BALL, N.G. & DYKE, I.J. An endogenous 24 hours rhythm in the growth rate of the avena coleoptile. *Journal of Experimental Botany* 5: 426-433. 1954.
4. BUENNING, E. Endogenous rhythms in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 7: 71-90. 1956.
5. _____ & HESS, C. The formation of layers in the starch grain under constant external conditions. *Naturwissenschaften* 41: 339-340. 1954. Original not available for examination; abstracted in *Biological Abstracts* 30: 20540. 1956.
6. BUHNEMANN, F. Rhythmic spores formation of Oedogonium cardiacum. *Biol. Zentralbl.* 74: 1-54. 1955. Original not available for examination; abstracted in *Biological Abstracts* 31: 20502. 1956.
7. COLEMAN, R.G. The effect of sulphur deficiency on the amino acids of some plants. *Australian Journal of Biological Science* 10: 50-56. 1957.
8. CONSDEN, R., GORDON, A.H. & MARTIN, A.J.P. Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. *Biochemical Journal* 38: 224-232. 1944. Original not available for examination; abstracted in *Chemical Abstracts* 39: 537. 1945.
9. COTRUFO, C. Studies of internal chemical changes of the potato tubers in relation to dormancy. *Dissertation Abstracts* 19: 28-29. 1958.
10. _____ & LEVITT, J. Investigations of the cytoplasmic particulates and proteins of potato tubers. IV. Nitrogen changes associated with emergence of potato tubers from the rest period. *Physiologia Plantarum* 11: 240-248. 1958.
11. DANIEL, T.W. Coniferous root exudate. *Plant Physiology* 24: 327. 1949.
12. DE KOCH, P.C. & MORRISON, R.I. The metabolism of chlorotic leaves. I. Amino acids. *Biochemical Journal* 70: 266-272. 1958.
13. FIFE, I.E. & STOKES, P. Amino acid changes identify ratoon stunting disease. *Sugar y Azúcar* 54: 27-28. 1959.

14. FINE, McH.J. & BARTON, L.V. Biochemical studies of dormancy and after ripening in seeds. I. Changes in free amino acids content. Contributions from Boyce Thompson Institute. 19: 483-500. 1958.
15. FOLKES, B.F. & YEMM, E.W. The respiration of barley plants. The New Phytologist 57: 106-131. 1958.
16. FRENEY, J.R., DELWICHE, C.C. & JOHNSON, C.M. The effect of chloride on the free amino acids of cabbage and cauliflower plants. Australian Journal of Biological Sciences 12: 160-166. 1959.
17. GALSTON, A.W. & DALBERG, L.Y. The adaptative formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. American Journal of Botany 41: 373-380. 1954.
18. GROSSENBACHER, K.A. Autonomic cycle of rate of exudation of plants. American Journal of Botany 26: 107-109. 1939.
19. HAGAN, R.M. Autonomic diurnal cycles in the water relations of non-exuding detopped root system. Plant Physiology 24: 441-454. 1949.
20. HAGEN, G.L. & GURCKEL, J.E. Free amino acid levels in Nicotiana glauca, N. langsdorffii and their interspecific hybrid following gamma irradiation. Plant Physiology 33: 439-443. 1958.
21. HENSEN, A. Die Dauerorgane von Spirodela polyrrhiza Schlied in physiologischer Betrachtung. Flora 141: 523-566. 1954.
22. INGOLD, C.T. & COX, V.J. Periodicity of spore discharge in Daldinia. Annals of Botany [new series] 19: 201-209. 1955
23. JONES, S. Heterophylly in some species of Callitriche, with special reference to Callitriche intermedia. Annals of Botany, new series 19: 225-245. 1955.
24. KAZARYAN, V.O. & AVUNDZHYAN, E.S. The change of amino acid composition of the leaves of Perilla ocymoides, in relation to the development of the raceme. Doklady Akad. Nauk Armyan S.S.R. 28: 133-136. 1959. Original not available for examination; abstracted in Chemical Abstracts 54: 7825. 1960.
25. KRETZMANN, M.G. The mechanism of formation of amino acids in surviving animal tissues from pyruvate and ammonia. Journal of Biological Chemistry 167: 77-100. 1947.
26. KOJIMA, H., YATAZAMA, M. & GOTO, Y. Interconversion of amino acids at an early stage of germination of plant seeds. Science Repts. Shiga Agro. Ser. I. 4: 51-56. 1953. Original not available for examination; abstracted in Chemical Abstracts 50: 9527. 1956.
27. KUMMEROW, J. Endogene Schwankungen der Keimfähigkeit bei Dactylis glomerata. Naturwissenschaften 47: 262-263. 1960.
28. LEVITT, J. Investigations of the cytoplasmic particulates and proteins of potato tubers. Physiologia Plantarum 7: 597-601. 1954.

29. MBS, M.G. & MENGE, I. Potato shoot and tuber cultures in vitro. *Physiologia Plantarum* 7: 637-649. 1954.
30. MONTANT, C. Modification of the metabolism of the free amino acids in Sempervivum tectorum L. parasited by Endophyllum sempervivi, *Lev. Rev. Española Fisio.* 15: 173-178. 1959. Original not available for examination; abstracted in *Biological Abstracts* 35: 42576. 1960.
31. MOKRONOSOV, A.T. & IVANOVA, L.V. & ZOLNIKOV, V.D. Synthesis of amino acids in roots of the potato plant at various periods of the day and under various photoperiodic conditions. *Plant Physiology (Fiziologiya Rastenii)* 6: 167-173. 1959.
32. NUCCORINI, R. The significance of glutamine in germination. *Annali di chimica applicata* 20: 239-244. 1930. Original not available for examination; abstracted in *Chemical Abstracts* 24: 5332. 1930.
33. PIRSON, A. & GOLLNER, E. Beobachtungen zur Entwicklungsphysiologie der Lemna minor L. *Flora* 140: 485-498. 1953.
34. PLAISTED, P.H. Clearing free amino acid solutions of plant extracts for paper chromatograms. *Contributions from Boyce Thompson Institute* 9: 231-244. 1958.
35. PLESHKOV, B.P., SHMYREYA, T.B. & IVANKO, S. The free amino acid content of leaves and roots of maize as related to nutritional conditions. *Plant Physiology (Fiziologiya Rastenii)* 6: 674-683. 1960.
36. _____, IVANKO, S. & ANTONOVA, G.V. The influence of nutritional conditions on the free amino acid content of bean leaves. *Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R. (Bot. Sci./ Sect)* 117: 284-287. 1957. Original not available for examination; abstracted in *Biological Abstracts* 39: 15317. 1959.
37. _____ & FOWDEN, L. Amino acid composition of the proteins of barley leaves in relation to the mineral nutrition and age of plants. *Nature* 183: 1445-1446. 1959.
38. PORTER, A.C., MARGOLIS, D. & SHARP, P. Quantitative determination of amino acids by paper chromatography. *Contributions from Boyce Thompson Institute* 18: 465-476. 1957.
39. POSSINGHAM, J.V. The effect of mineral nutrition on the content of free amino acids and amides in tomato plants. I. A comparison of the effects of deficiencies of: Cu, Zn, Mn, Mo. *Australian Journal of Biological Sciences* 9: 539-551. 1956.
40. RIJVEN, A.H.G.C. Glutamine and asparagine as nitrogen sources for the growth of plant embryos in vitro. A comparative study of 12 species. *Australian Journal of Biological Sciences* 9: 511-527. 1956.
41. ROBERTS, E.A. & PROCTOR, B.E. The appearance of starch grains of potato tubers of plants grown under constant light and temperature conditions. *Science* 119: 509-510. 1954.

42. SATAROVA, N.A. The amino acid content of freshly harvested potato tubers with disturbed dormancy. *Fiziologiya Rastanii* 2: 529-532. 1955. Original not available for examination; abstracted in *Biological Abstracts* 32: 42013. 1958.
43. SCARASCIA-VENEZIAN, M.E. & GIOVANNONZI-SERMANI, G. On the aging of *Nicotiana* seed, cytological and biochemical observations. *Tobacco* 60: 278-285. 1956. Original not available for examination; abstracted in *Biological Abstracts* 31: 36059. 1957.
44. SOBACHKIN, A.A. The effect of Mo on the synthesis of plant amides and amino acids. *Doklady Moskov Selkhoz Akad. im. K.A. Timinyazeva* 34: 55-58. 1958. Original not available for examination; abstracted in *Chemical Abstracts* 53: 16292. 1959.
45. STEINBERG, R.A., BOWLING, J.E. & MURTREY, J.E. Accumulation of free amino acids as a chemical basis for morphological symptoms in tobacco manifesting frencing and mineral deficiency symptoms. *Plant Physiology* 25: 279-288. 1950.
46. STEWARD, F.C. & POLLARD, J.K. Nitrogen metabolism in plants: ten years in retrospect. *Annual Review of Plant Physiology* 8: 65-114. 1957.
47. _____, THOMPSON, J.F. & DENT, C.E. Gamma aminobutyric acid a constituent of potato tuber? *Science* 100: 439-440. 1949.
48. _____, _____ & POLLARD, J.K. Contrasts in the nitrogenous composition of rapidly growing and non-growing plant tissues. *Journal of Experimental Botany* 9: 1-10. 1958.
49. STOEV, K.D., MAMAROV, P.T. & BENCHEV, I.B. Chromatographic analysis of sugar and free amino acids in the sap of grape vine. *Plant Physiology (Fiziologiya Rastanii)* 6: 424-430. 1959.
50. STOKES, P. The stimulation of growth by low temperature in embryos of *Heracleum sphondylium* L. *Journal of Experimental Botany* 4: 22-34. 1953.
51. SZALAI, I. The distribution of free amino acids in the potato tuber and their influence on Jarowisation. I. Photometric determination of the total amino acid spectrum in potato juice by means of the ninhydrine reaction. *Acta Biologica (Szaged)* 3: 33-40. 1957. Original not available for examination; abstracted in *Biological Abstracts* 35: 56872. 1960.
52. TRUBETSKOVA, O.M. & ZHIRNOVA, N.G. The diurnal rhythm of potassium transfer from the root system to the aerial organs of plants. *Plant Physiology (Fiziologiya Rastanii)* 2: 141. 1960.
53. VAN DIE, J. Diurnal rhythm in the amino acid content of xylem exudate from tomato plants bleeding under constant environmental conditions. *Koninklijke Vlaamse Academie voor Wetenschappen. Proceedings* 62: 50-58. 1959. Original not available for examination; abstracted in *Chemical Abstracts* 53: 15229. 1959.

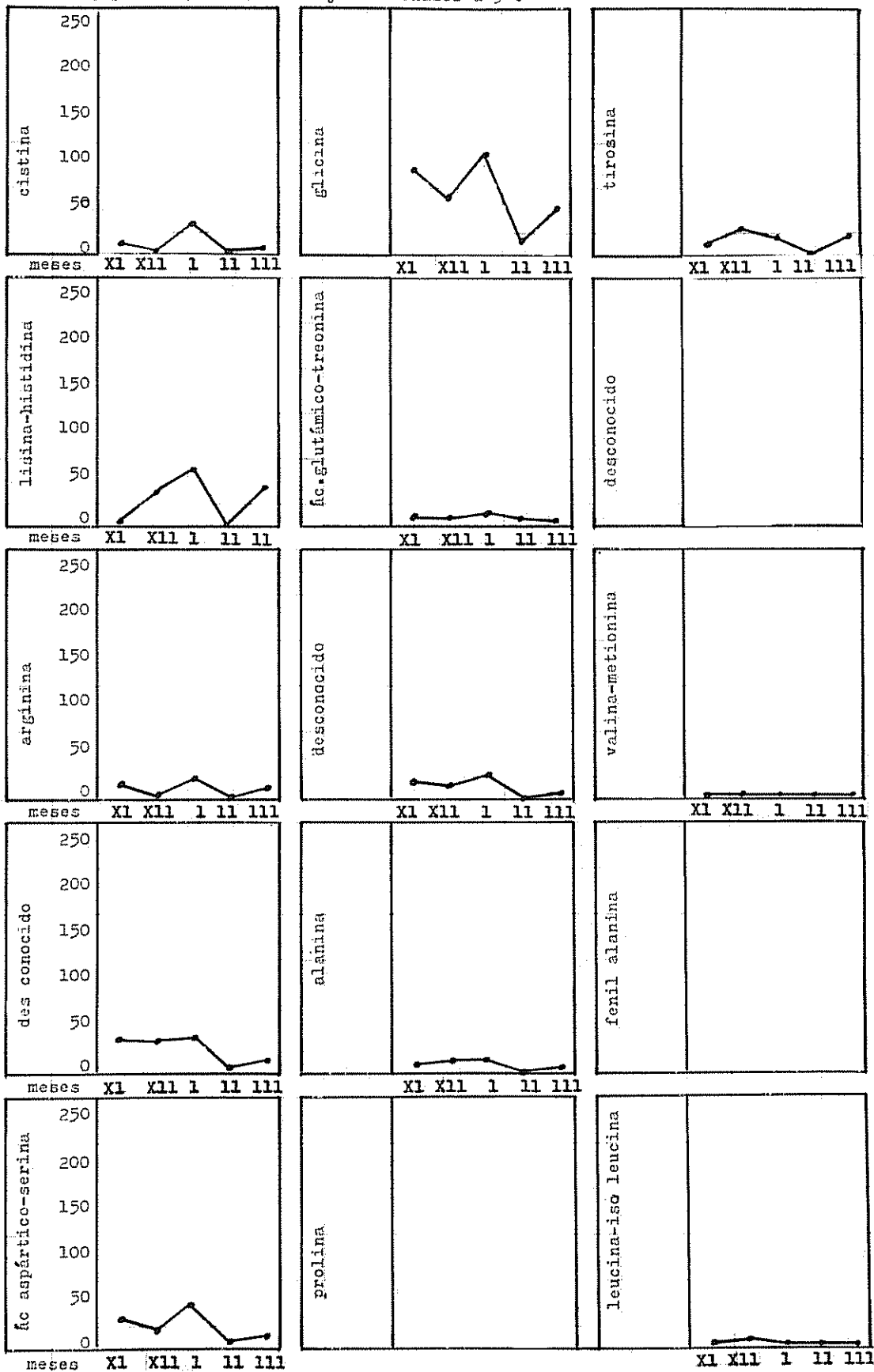
54. VALLANCE, K.B. The germination of the seed of Rhinanthus Crista-galli. Annals of Botany, new series 16: 409-420. 1952.
55. WILDING, D.M., STAHMANN, N.A. & SMITH, D. Free amino acids in alfalfa as related to cold hardiness. Plant Physiology 35: 726-732. 1960.
56. WEBSTER, G.C. Nitrogen metabolism. Annual Review of Plant Physiology 6: 45-70. 1953.
57. YEMM, E.W. & FOLKES, B.F. The metabolism of amino acids and proteins in plants. Annual Review of Plant Physiology 9: 245-280. 1958.

A P E N D I C E

Cuadro N°6

Variaciones mensuales de amino ácidos libres totales en cariopses cosechados en Vallenar y almacenados a 50C

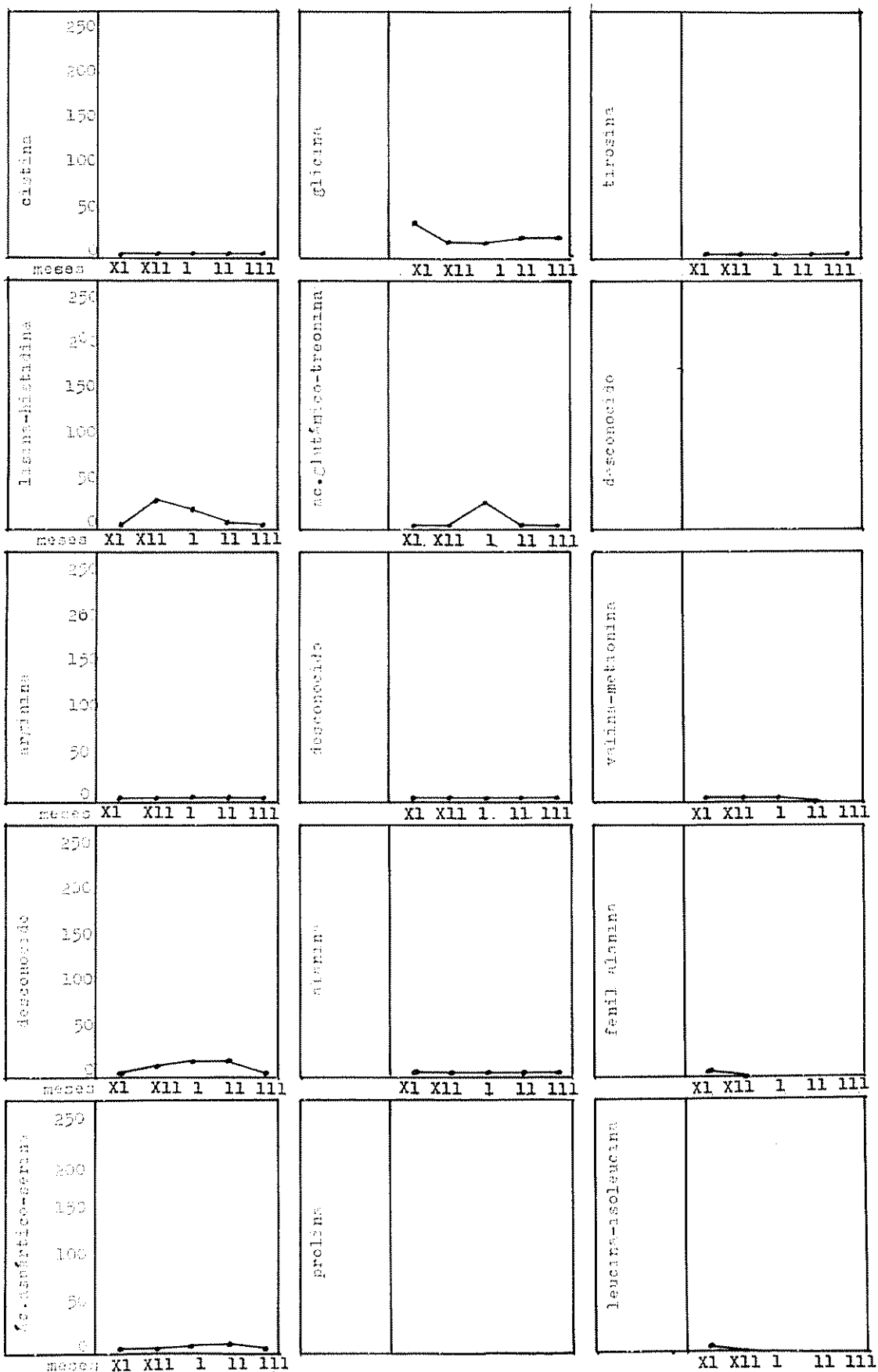
cantidad óptima x 1000



Cuadro N° 7

Variaciones mensuales de amino ácidos libres totales en cariopses cosechados en Vallenar y almacenados a 25°C

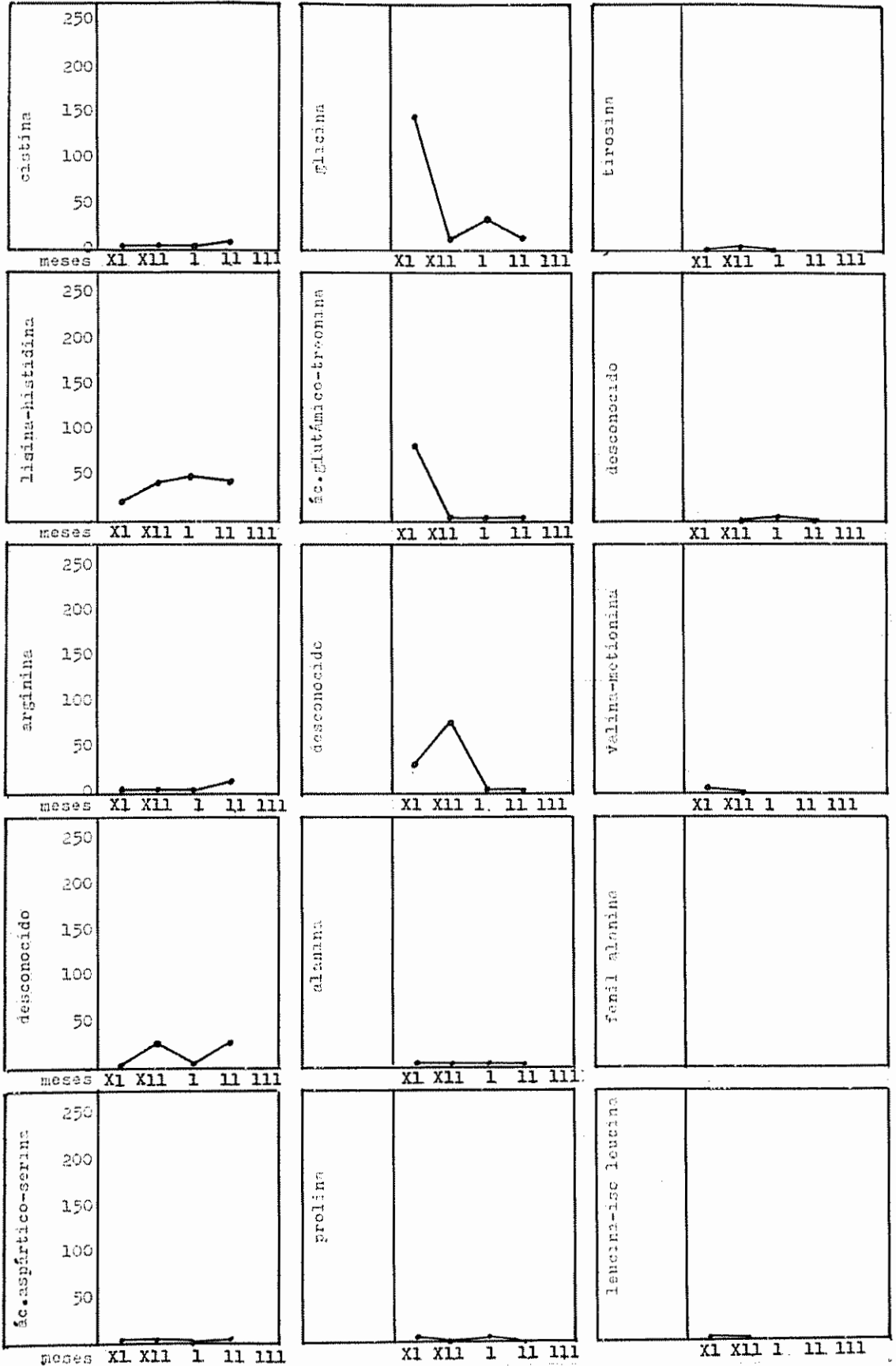
densidad óptica x 1000



Cuadro N°8

Variaciones mensuales de amino ácidos libres totales en carioceas cosechados en Serena y almacenados a 2500 ★

densidad óptica x 1000

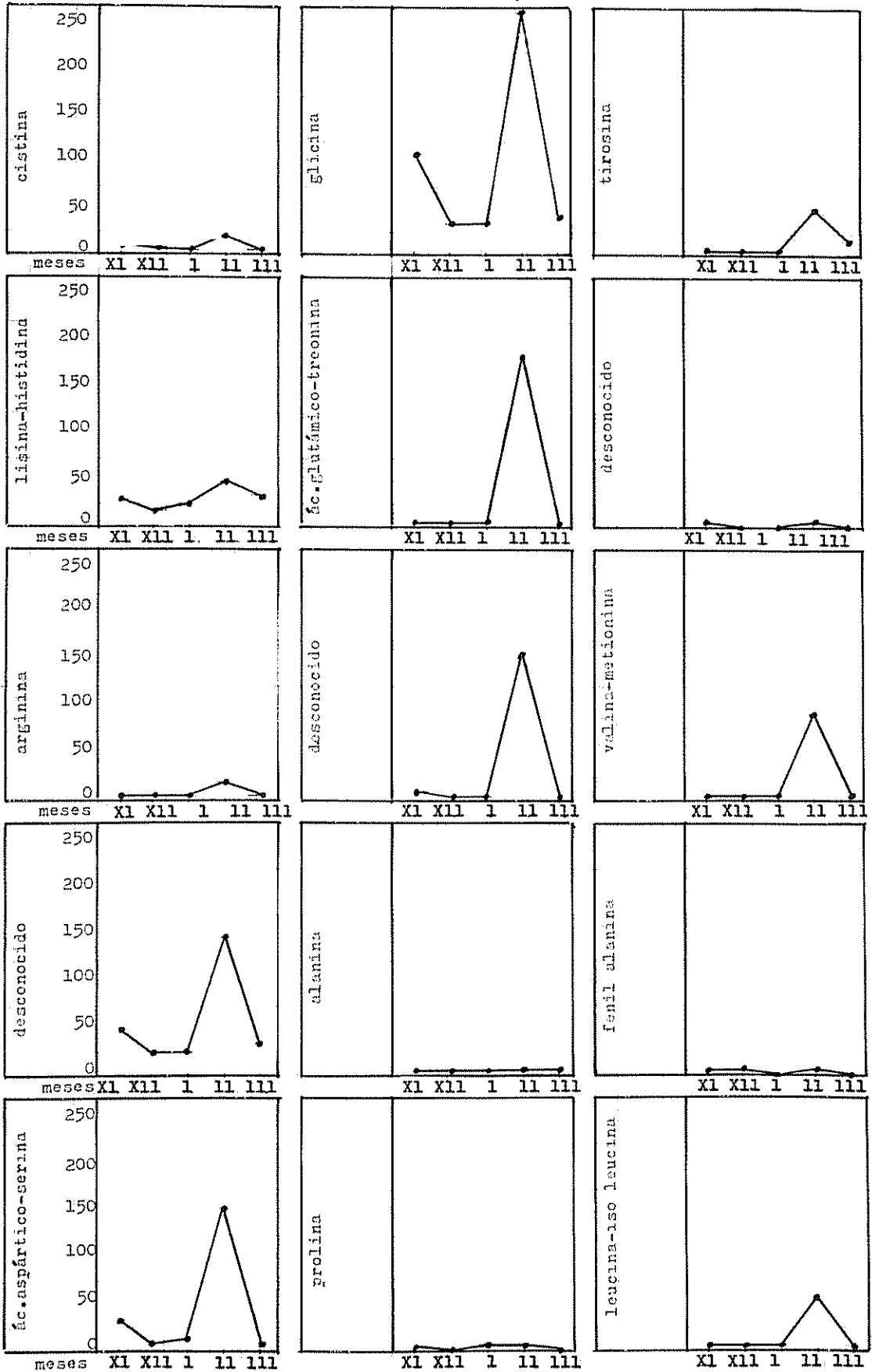


★ El mes de Marzo no fue analizado.

Cuadro N° 9

Variaciones mensuales de amino ácidos libres totales en cariopses cosechados en Rinconada y almacenados a 50C

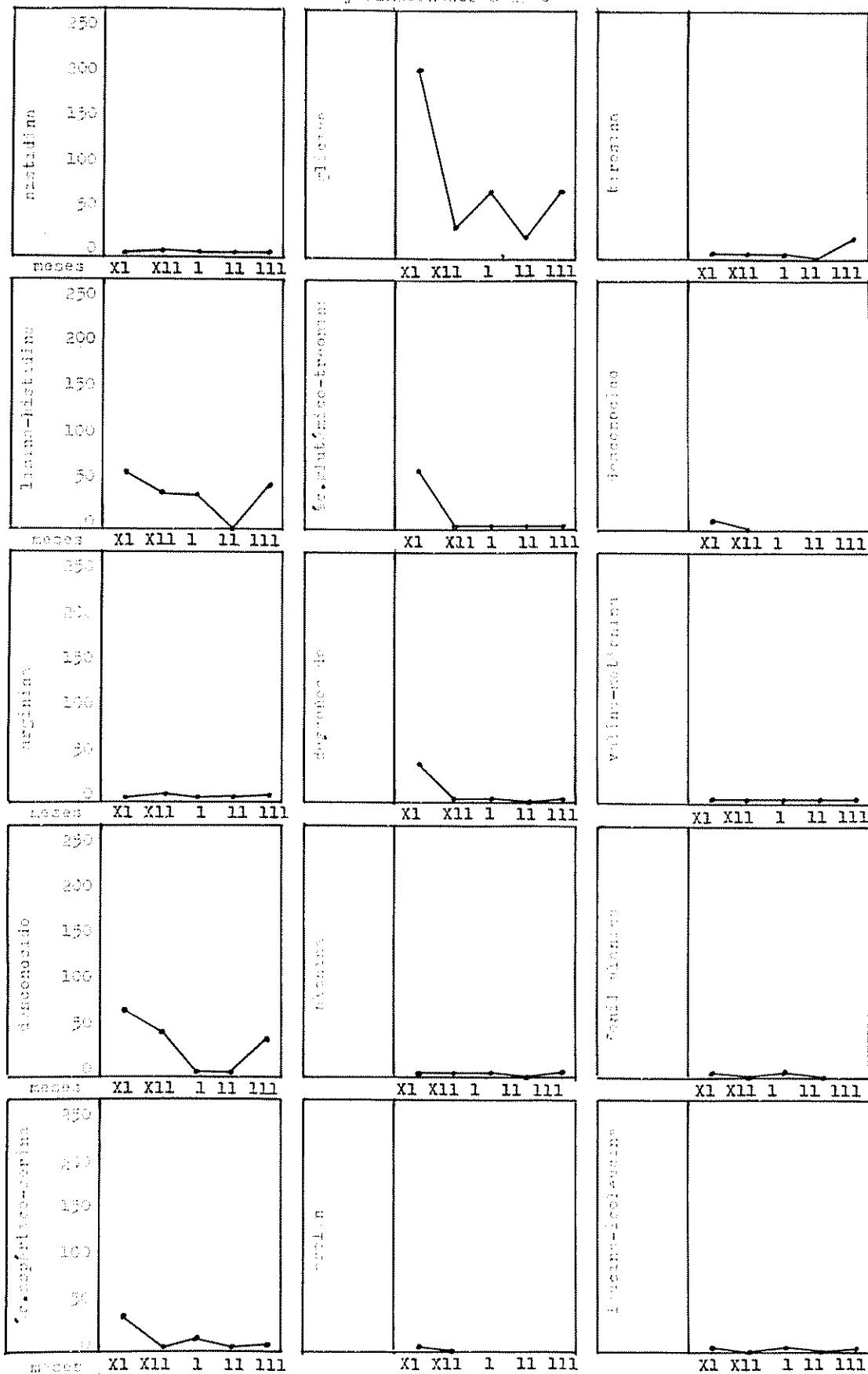
densidad óptica x 1000



Cuadro N°10

Variaciones mensuales de aminoácidos libres y sus sales en el proceso de cosecha, dos en Rincón de la Libertad y almacenados a 10°C

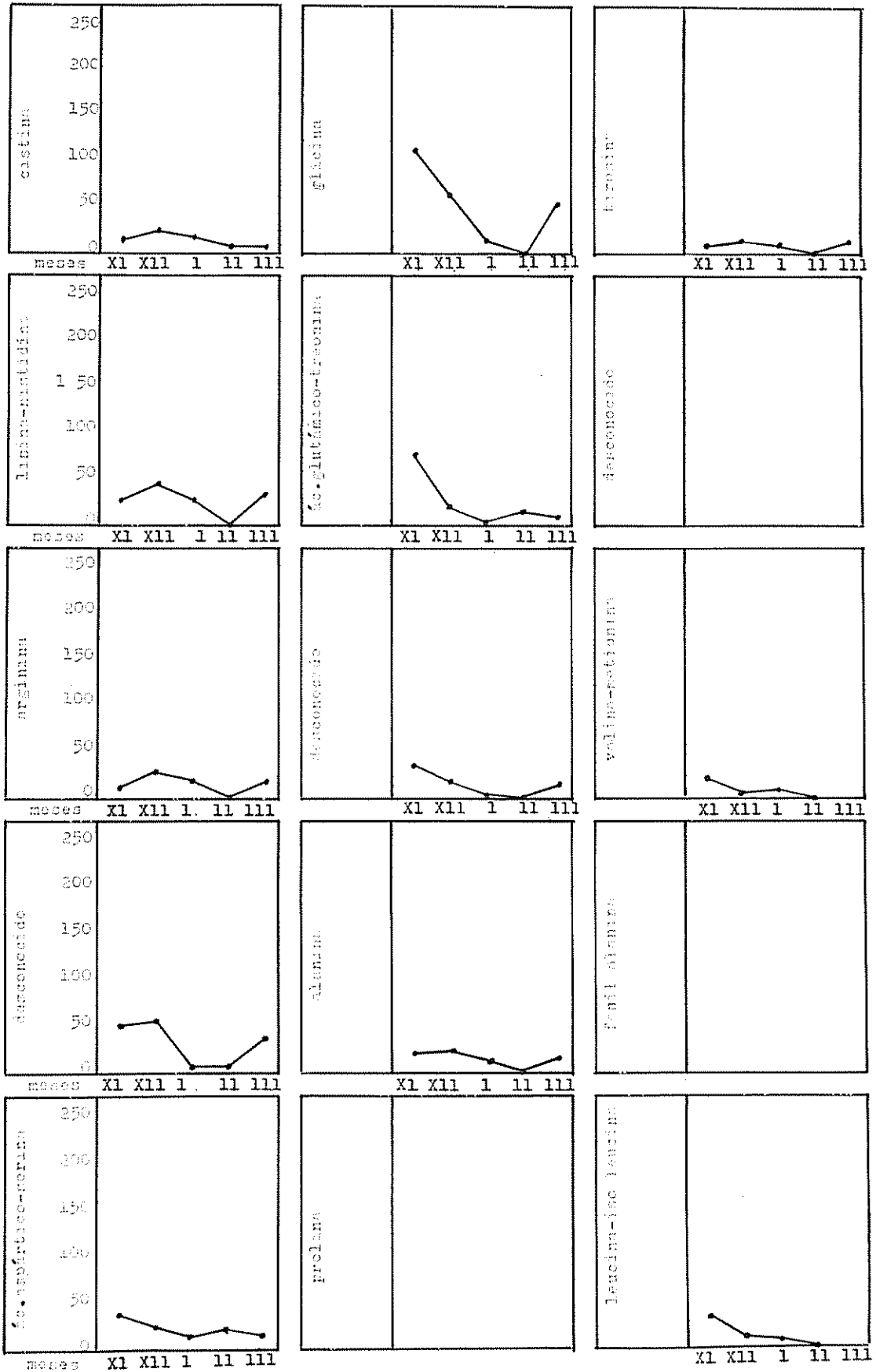
Densidad óptica x 1000



Cuadro N°11

Variaciones mensuales de amino ácidos: libros totales en corripagos cosechados en Curice y almacenados a 25°C

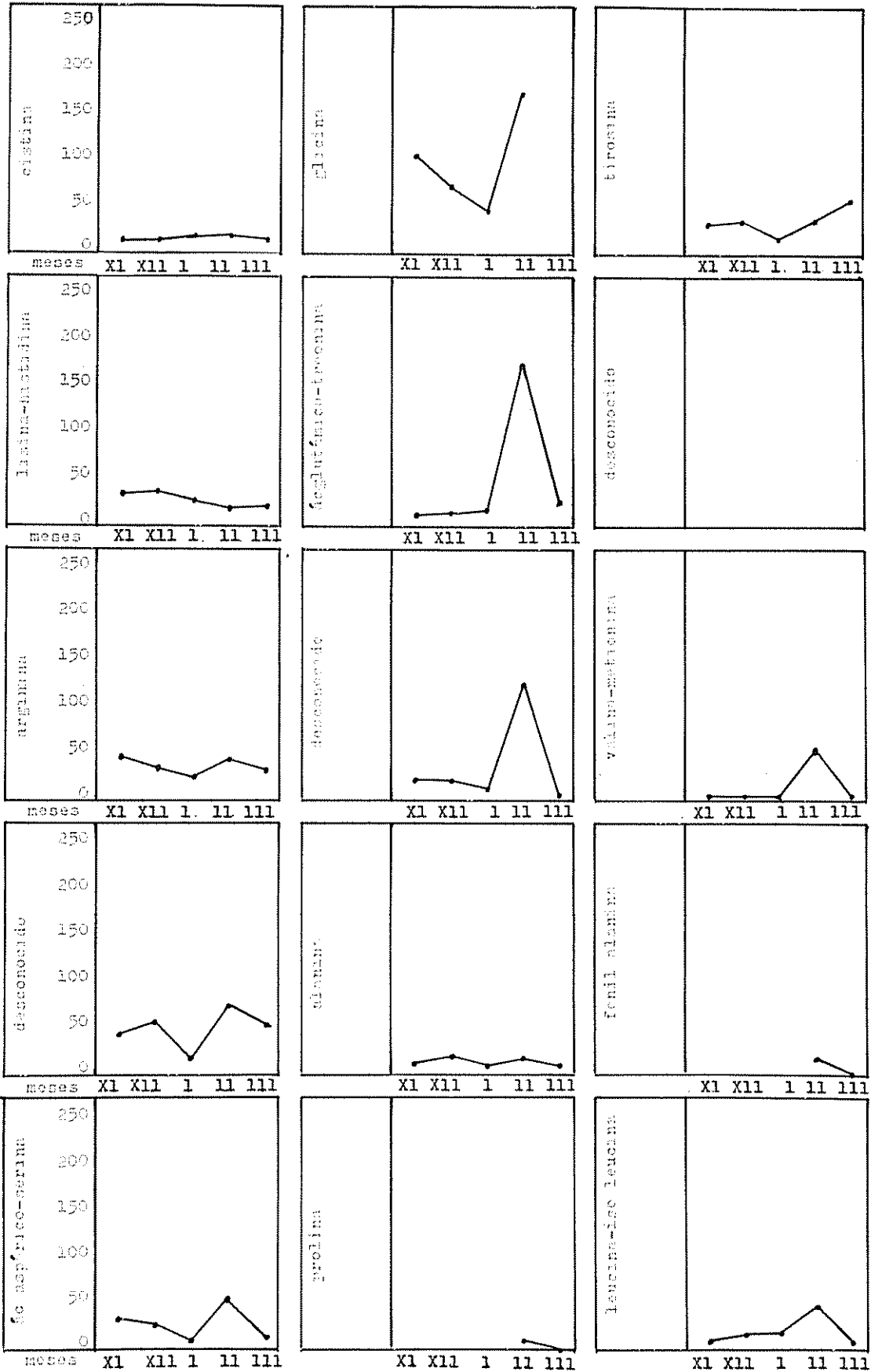
densidad óptica x 1000



Cuadro, Nº 12

Variaciones mensuales de aminoácidos libres totales en carbopeces cosechados en Chillan y almacenados a 5°C

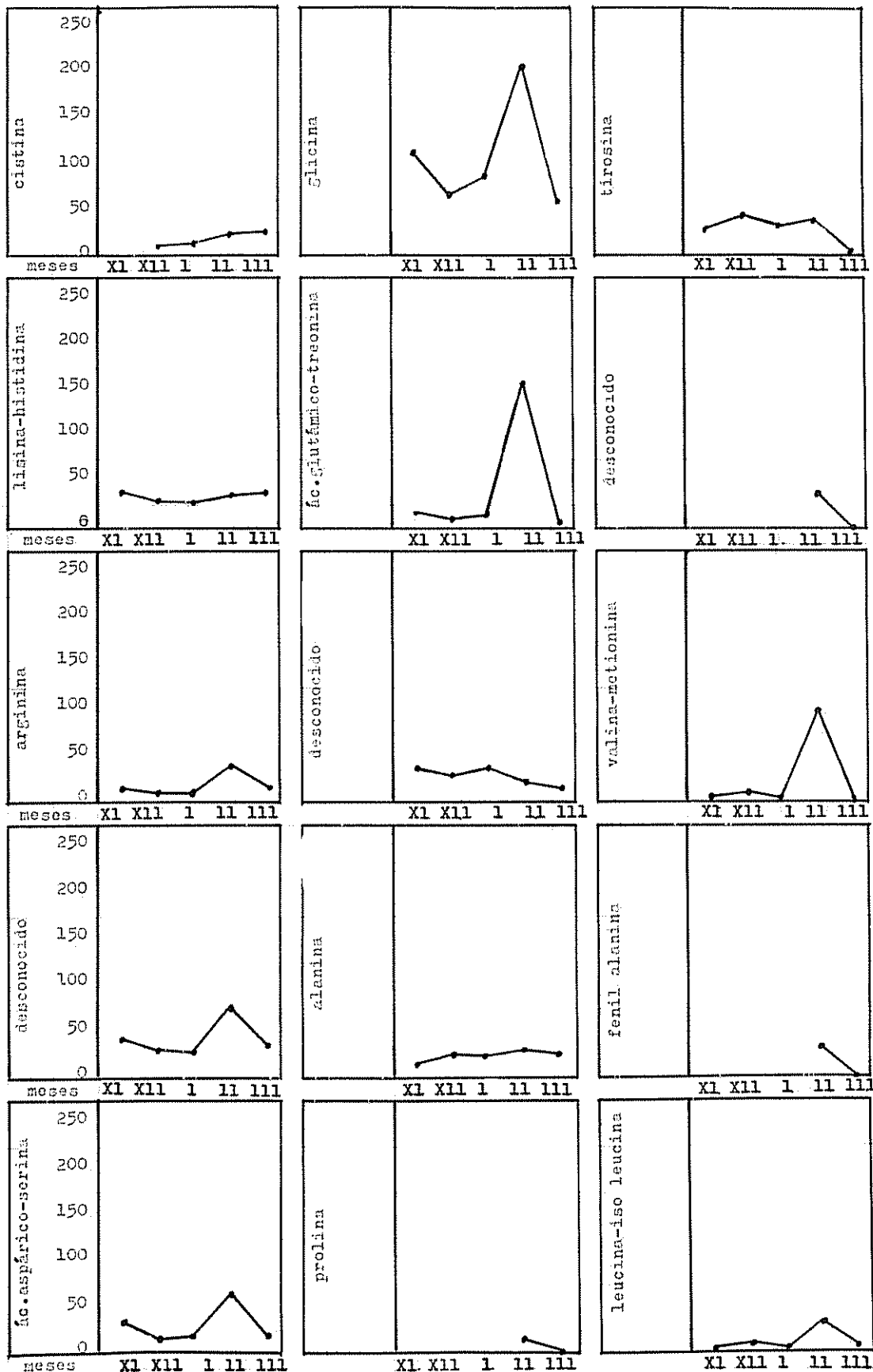
densidad óptica x 1000



Cuadro Nº 13

Variaciones mensuales de amino ácidos libres totales en carioptes cosechados en Chillan y almacenados a 25°C

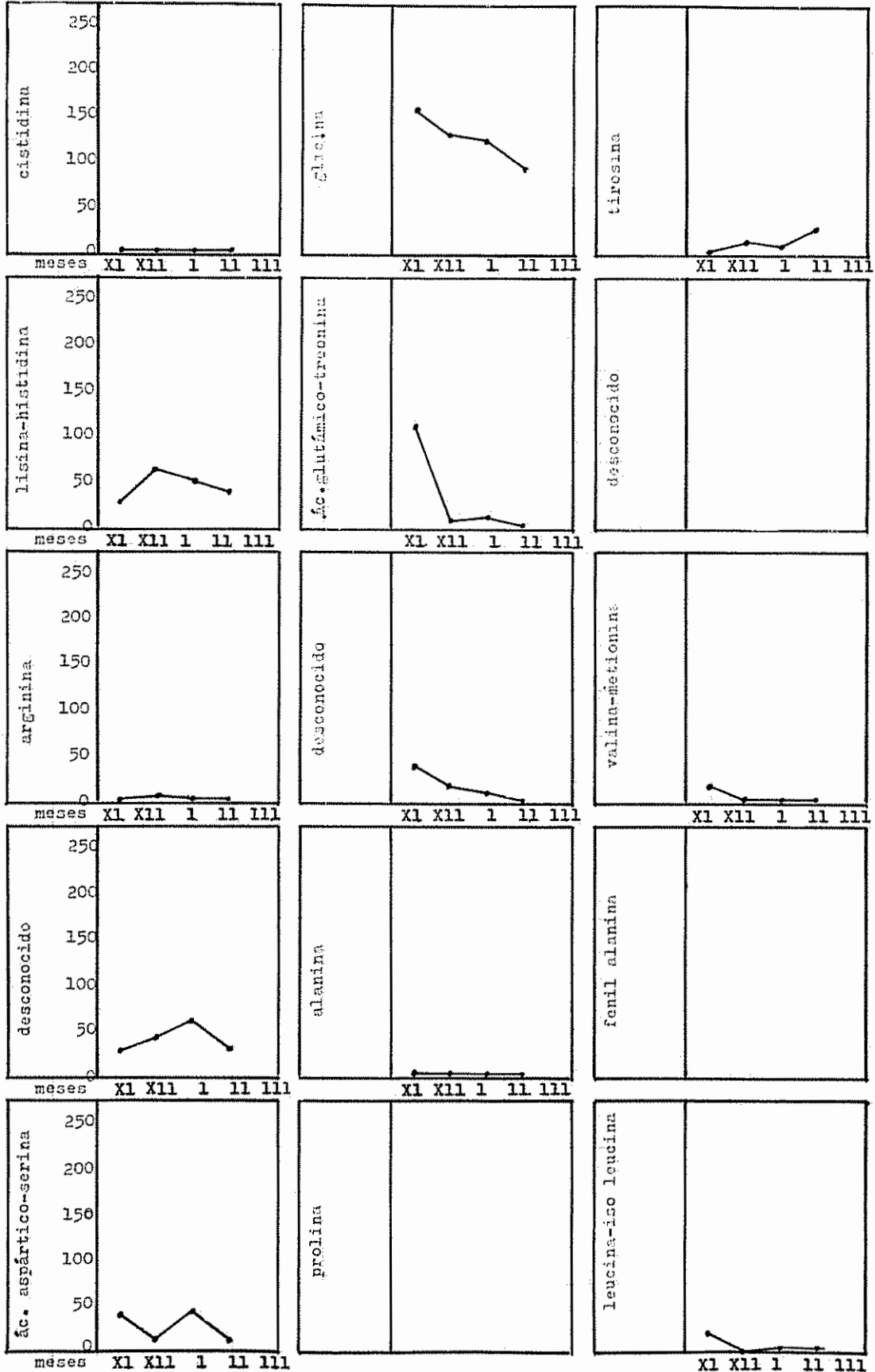
densidad óptica x 1000



Cuadro N°14

Variaciones mensuales de amino ácidos libres totales en cariopeas cosechados en Los Angeles y almacenados a 25°C ★

densidad óptica x 1000

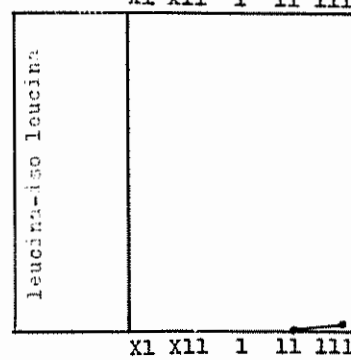
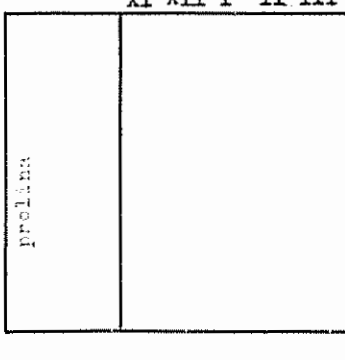
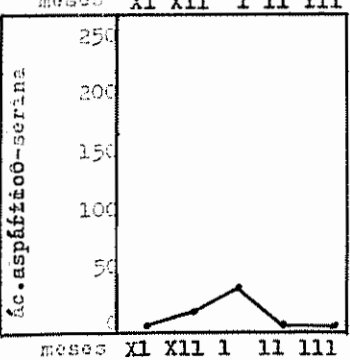
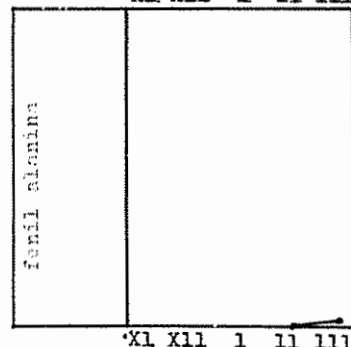
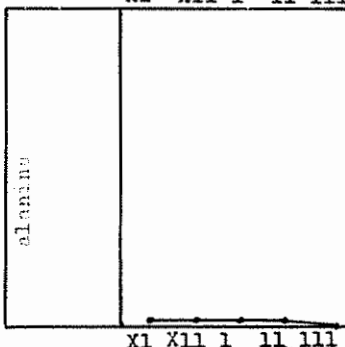
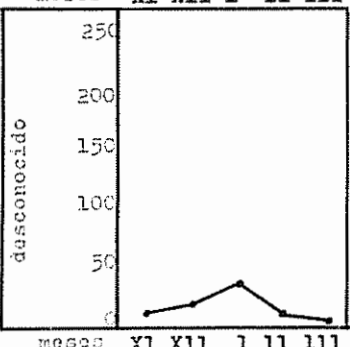
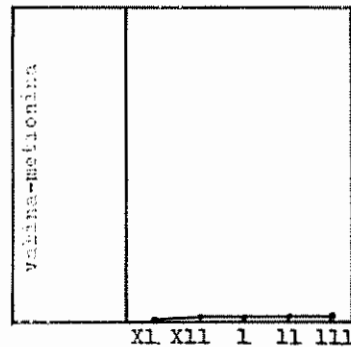
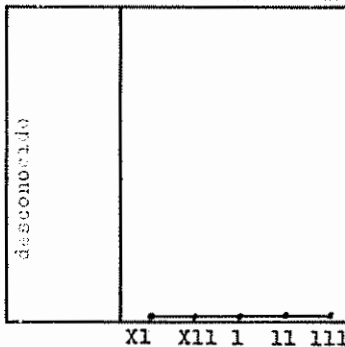
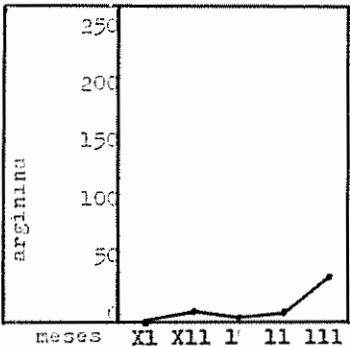
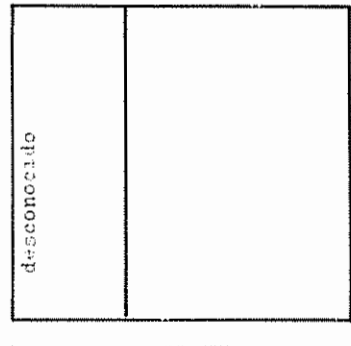
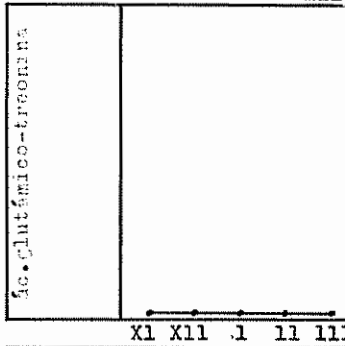
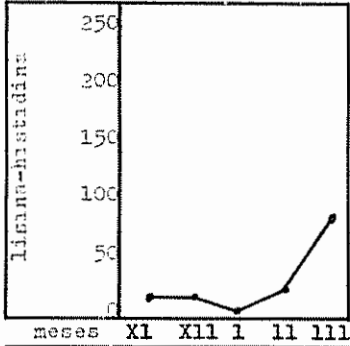
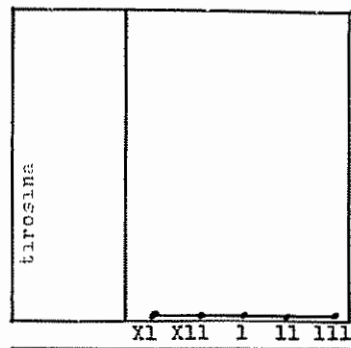
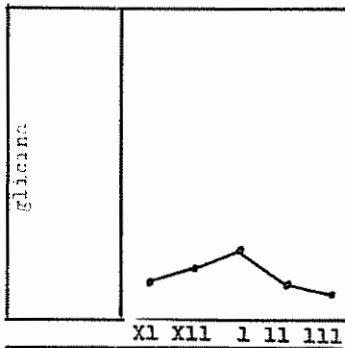
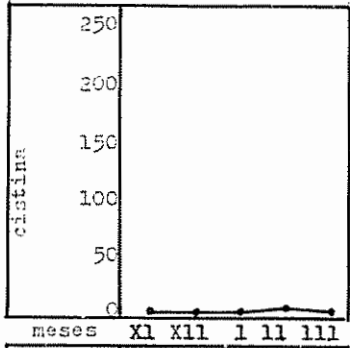


★ El mes de Marzo no fue analizado.

Cuadro Nº 15

Variaciones mensuales de amino ácidos libres totales en cariopees cosechados en Valdivia y almacenados a 25°C

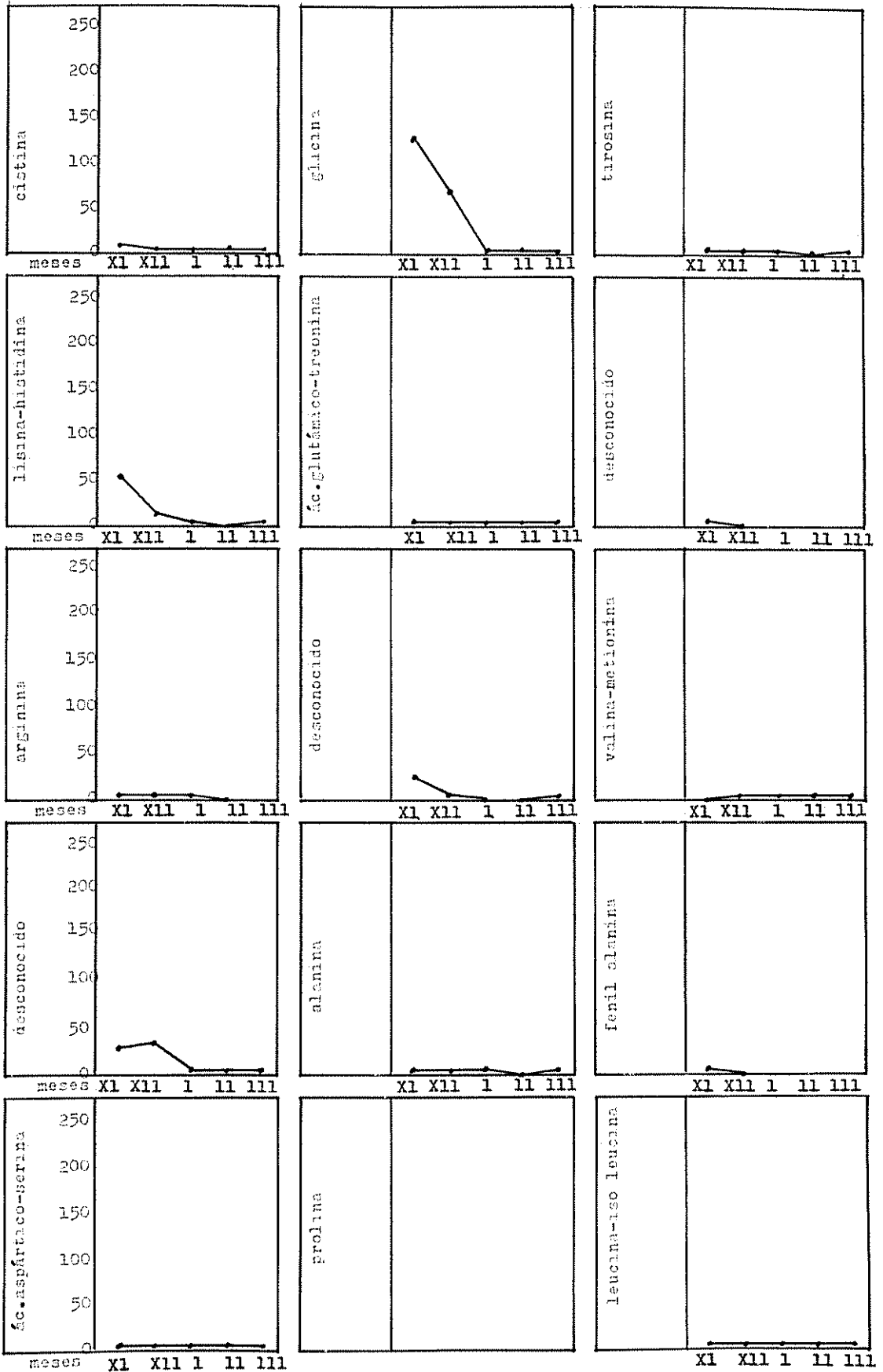
densidad óptica x 1000



Cuadro N°16

Variaciones mensuales de amino ácidos libres totales en cariopsees cosechados en Osorno y almacenados a 500

densidad óptica x 1000



Cuadro N°17

Variaciones mensuales de amino ácidos libres totales en cariopses cosechados en Osorno y almacenados a 25°C

densidad óptica x 1000

