



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"ESTUDIOS SOBRE EL CONTROL HORMONAL DEL
METABOLISMO DE MEMBRANA EN CAPA DE
ALEURONA DE TRIGO"**

T E S I S

que para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a :

MIGUEL ANGEL GOMEZ LIM

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Página

Resumen	I
Objetivo	II

CAPITULO I

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

1.1	Composición química de las membranas	1
1.1.1	Lípidos	2
1.1.2	Proteínas	7
1.1.	Otros constituyentes	8
1.2	Estructura de la membrana	9
1.3	Funciones de los lípidos en las membranas	12
1.4	Estructura del grano de trigo	16
1.4.1	Gránulos de aleurona	16
1.5	Composición química de la semilla de trigo	17
1.6	Los lípidos del trigo	18
1.7	Proceso de la germinación	19
1.8	El Sistema Endomembranal	22
1.9	El control hormonal del desarrollo y metabolismo membranar	25

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

2.1	Material de vidrio	31
2.2	Disolventes	31
2.3	Radioisótopos	31
2.4	Material biológico	31
2.5	Preparación y esterilización de las semillas	31
2.6	Aislamiento de la aleurona	32
2.7	Incubación de las aleuronas	32
2.8	Radiomarcado de los lípidos de la aleurona	34

2.9	Extracción de los lípidos	34
2.10	Purificación del extracto lipídico	35
2.11	Determinación de fósforo en lípidos	37
2.12	Determinación de la incorporación de colina-Me- ¹⁴ C	38
2.13	Separación de lípidos	38
2.14	Preparación de muestras para cromatografía de gases	39
2.15	Cromatografía de gases	40

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1	Niveles de fosfolípidos totales de la capa de aleurona de trigo	45
3.2	Incorporación de colina-Me- ¹⁴ C en fosfolípidos de la capa de aleurona de trigo	45
3.3	Cambios en la composición de lípidos de la aleurona de trigo	48

Conclusiones	56
Bibliografía	57

Resumen

Se ha comprobado que el ácido giberélico (AG_3) actúa sobre el tejido de la aleurona de cebada y trigo, induciendo la síntesis de novo de varias enzimas hidrolíticas, incluyendo la alfa-amilasa y la proteasa, y su liberación al medio. La síntesis de ambas enzimas es prevenida por inhibidores de la transcripción y de la traducción y la respuesta al AG_3 es inhibida por el ácido abscísico (AAB). Recientemente se ha encontrado que el etileno estimula la síntesis de alfa-amilasa inducida por AG_3 en aleurona de trigo, al igual que incrementa la secreción de la enzima hacia el endospermo almidonoso del grano. Todo ello hace suponer un posible efecto sobre las membranas de las células de la aleurona.

En el presente trabajo se examinaron los niveles de fosfolípidos de la aleurona de trigo aislada, observándose que ninguna de las tres hormonas aquí utilizadas (AG_3 , AAB y etileno) tiene efecto sobre ellos, lo que confirma estudios previos.

Los estudios con precursores radioactivos permitieron confirmar la sugerencia de que la imbibición es el estímulo inicial para la síntesis de membrana en este tejido. Ni el AG_3 ni el etileno tuvieron efecto sobre la incorporación de colina- $Me-^{14}C$; aunque el AAB tuvo un efecto inhibitorio sobre esta. El etileno fue capaz de revertir completamente este efecto, sin requerir la presencia del AG_3 . Todos estos efectos son similares a la interacción previamente reportada para estas hormonas en el control de la formación de alfa-amilasa en aleurona de cereales.

Todas las hormonas aquí utilizadas tuvieron efectos sobre la composición de ácidos grasos de la capa de aleurona. En la fracción de lípidos polares fue en donde se observaron los efectos más intensos de las hormonas, en comparación con los lípidos neutros. En términos generales se observó un incremento en la proporción de ácidos grasos insaturados en relación a los saturados por efecto del AG_3 . El AAB, por otro lado, disminuyó esta relación. En los lípidos neutros también se observaron cambios en los ácidos grasos por efecto de las hormonas, aunque no tan pronunciados como en los polares. En todos los casos fue evidente que el AAB tenía un efecto distinto al del AG_3 , siendo incluso capaz de inhibir su efecto. En este caso, el etileno no fue capaz de revertir el efecto del AAB, algo también similar a la interacción entre estas hormonas en el control de la síntesis de alfa-amilasa en este tejido.

OBJETIVO

Con el creciente aumento de la población, la demanda mundial de alimentos se ha convertido en un problema para la humanidad hasta ahora sin resolver. De todos los alimentos producidos, las semillas representan hasta un 90%, constituyendo solamente los cereales un 75% de esa proporción. Por ello el interés se ha centrado a últimas fechas en la posibilidad de mejorar el rendimiento y la productividad de los cereales.

Una gran cantidad de investigaciones se han centrado en los eventos fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante la germinación, los cuales controlan en cierta forma la productividad.

Este trabajo tiene como finalidad contribuir al conocimiento de estos fenómenos en la germinación del grano de trigo, en especial lo concerniente al metabolismo de membrana, por estar íntimamente relacionado con la movilización y asequibilidad de los nutrientes almacenados, que son esenciales para el desarrollo de la plántula.

Una característica intrínseca de los seres vivos es que su medio interno difiere, en ocasiones considerablemente, del medio que los rodea. Además, el desarrollo y el control del metabolismo celular dependen de que el factor correspondiente, como una hormona, un agente físico etc., esté presente en el tiempo y en el lugar correcto. Ambas propiedades están directamente relacionadas con las membranas, las cuales no sólo rodean a la célula sino que la dividen internamente en varios compartimientos, jugando de esta manera un papel más activo que el que le conferían en la antigüedad, cuando las consideraban como simples interfases o barreras entre dos fases continuas sin darles un reconocimiento pleno de entidades estructurales, dinámicas y selectivas. De aquí, resulta obvio que el entendimiento de los mecanismos de control y desarrollo celular debe incluir un conocimiento de la estructura y composición de las membranas, de los mecanismos por los cuales los materiales pasan a través de ellas y de los medios por los cuales la célula controla las propiedades de las membranas para satisfacer sus necesidades en un ambiente siempre cambiante.

I.I. Composición química de las membranas

Para el estudio de las membranas celulares, es necesario y lo ha sido casi siempre, su aislamiento y purificación. Este proceso es sumamente sencillo en las células animales, pero en las vegetales se dificulta por la presencia de la pared celular. Sin embargo, a pesar de estas dificultades, fué evidente desde los estudios iniciales que los componentes primordiales eran lípidos y proteínas (Overton, 1900). Pero el hecho de que las proporciones que ambos compuestos guardan entre sí es característico de cada tipo particular de membrana, sólo fue reconocido hasta hace algunos años (Veerkamp et al, 1962).

De un modo muy general, se puede decir que los lípidos constituyen la matriz de las membranas. Por esta razón es cada vez más evidente que muchas de las propiedades características de las membranas, entre ellas las relacionadas con permeabilidad, dependen de la naturaleza de los lípidos membranales (Chapman, 1968; Simon, 1974).

I.I.I.

L í p í d o s

Los lípidos, sustancias heterogéneas solubles en mayor grado en solventes orgánicos que en agua, son las especies moleculares mayoritarias de las membranas (Veerkamp et al, 1962; Chapman, 1968; Benson y Jokela, 1976; Clarkson, 1977), constituyendo de un 20 a un 50% en peso seco (Benson y Jokela, 1976). Tales lípidos son por lo general moléculas "anfipáticas", es decir, con una parte polar y otra no polar. Esta característica es esencial para la estructura de la membrana (secc. 1.2).

Existen dos grandes categorías de lípidos en las membranas: polares y no polares, una clasificación basada en propiedades físicas mas que en algún carácter químico.

Los lípidos neutros comprenden principalmente triglicéridos, los cuales son, estructuralmente, más simples que los polares. Todos derivan del glicerol, el cual tiene esterificados los tres grupos hidroxilos con ácidos grasos (Fig. 1). El papel que tienen en una membrana no es tan importante como el de los lípidos polares, ya que no están implicados en procesos de permeabilidad ni tampoco contribuyen en forma sustancial a su estructura (Chapman, 1968; Clarkson, 1977).

En una determinada membrana o tejido, la cantidad de triglicéridos varía en relación con el tipo de estos. De tal manera que en las semillas los triglicéridos están en mucha mayor cantidad que los lípidos polares, debido fundamentalmente a que desempeñan un papel de reserva de energía (Fisher, 1962; Wolff, 1966), en las flores están en igual cantidad (Thompson, 1968) y en los órganos de almacenamiento como los cornos y tubérculos (Calliard, 1968) y en las hojas (Hitchcock y Nichols, 1971) están en mucha menor cantidad que los lípidos polares.

En el glicerol existen tres sitios potenciales en los cuales pueden unirse un ácido graso. Esto permite que, teóricamente al menos, exista una gran variedad de isómeros que se originen únicamente de una distribución

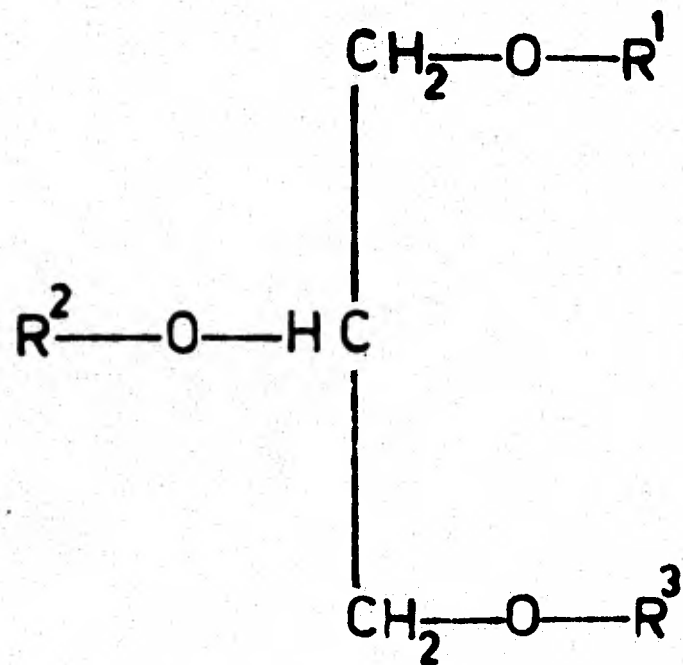


Fig. 1 ESTRUCTURA DEL GLICEROL
 $R^n = \text{Acido Graso}$

de distintos ácidos grasos en los tres hidroxilos de la molécula del glicerol. El escaso conocimiento que originalmente había sobre el tema, provocó que en los primeros estudios se propusiera que la distribución de los ácidos grasos en las tres posiciones era el azar. Esta teoría persistió mucho tiempo hasta que Norris y Mattil (1947), demostraron que la composición de diversos tejidos era específica y no admitía una distribución al azar. Posteriormente, Mattson y Volpenheim (1961), hidrolizaron triglicéridos naturales con lipasa pancreática, la cual libera grupos acilo unidos a grupos hidroxilos primarios y mostraron que hay una marcada preferencia de los ácidos grasos saturados para las posiciones 1 y 3 y una preferencia de los insaturados para la posición 2. De tal forma que en muchos aceites vegetales, del 95 al 100% de los ácidos grasos en la posición 2 son insaturados y de 18 átomos de carbono (Mattson y Volpenheim, 1963).

Todos estos estudios sirvieron para desechar definitivamente la teoría sobre el carácter aleatorio de la distribución de los ácidos grasos y llevaron, indirectamente, a la aceptación de la teoría de la distribución por posición, propuesta originalmente por Gunstone (1962) y Mattson y Volpenheim (1963). Esta teoría postula que los ácidos grasos de los triglicéridos naturales se dividen en dos clases: los que esterifican a las posiciones 1 y 3 y los que esterifican a la posición 2. Además, diversos estudios han mostrado que las posiciones 1 y 3 no son bioquímicamente equivalentes (De Hass y Van Deenen, 1964; Brockerhoff, 1967).

Hay cuatro tipos principales de lípidos polares: fosfolípidos, glucolípidos, sulfolípidos y poliisoprenoides. Sin embargo, los fosfolípidos son los más importantes para la estructura de la membrana.

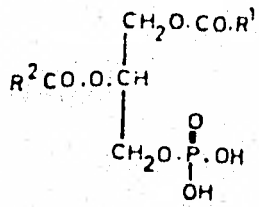
La característica distintiva de los fosfolípidos es su carácter anfipático. Esta propiedad les permite adoptar una estructura en forma de bicapa o capa bimolecular, tal y como fue descrita originalmente por Cortel y Grendel (1925). Todos los fosfolípidos derivan del ácido fosfatídico, el cual es el más simple de todos. Este fosfolípido se encuentra sólo en cantida-

des muy bajas o está ausente; de hecho algunos investigadores han considerado su presencia, como un artefacto producido por la actividad de la fosfolipasa D, durante la extracción de los fosfolípidos (Mazliak, 1973). La estructura de los fosfolípidos más importantes se observa en la figura 2.

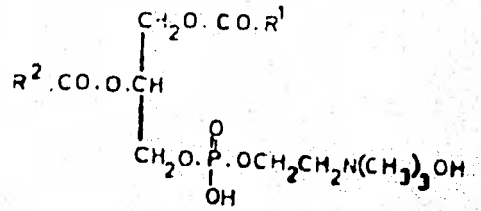
El fosfolípido más importante por su abundancia y el primero en ser caracterizado es la lecitina o fosfatidil colina (Douce et al, 1968). Este fosfolípido puede llegar a constituir hasta un 50% del contenido total de fosfolípidos en algunos tejidos, tales como hojas de espinaca (Wintermans, 1963) o frutos de manzano (Galliard, 1968). De distribución igualmente amplia es el fosfatidil etanolamina, aunque en cantidades mucho más variables que la lecitina, ya que constituye de un 23% de los fosfolípidos totales en hojas de remolacha (Wintermans, 1960) hasta un 1% en hojas de cebada (Benson y Maruo, 1958).

El fosfatidil serina se propuso como fosfolípido originalmente debido a la presencia de serina en hidrolizados lipídicos de cacahuete (Hutt et al, 1950). Posteriormente se identificó en extractos lipídicos de diversas algas y plantas superiores (Benson y Maruo, 1958; Benson y Strickland, 1960). Este fosfolípido es característico de tejidos animales y en los pocos casos en los que se ha identificado en tejidos vegetales, se ha encontrado en concentraciones tan bajas que se ha pensado en una contaminación de serina de origen proteico.

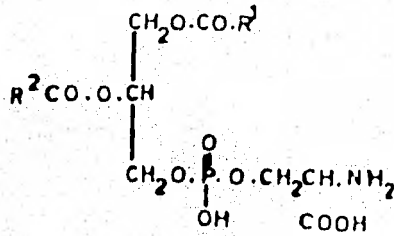
Un fosfolípido característico de tejidos fotosintéticos es el fosfatidil glicerol (Benson, 1971), pudiendo constituir hasta un 33% de los fosfolípidos totales (Roughan y Batt, 1969). Por ello es un constituyente menor de tejidos no fotosintéticos (Schwertner y Biale, 1973). Un fosfolípido cercanoamente relacionado con el anterior es el difosfatidil glicerol, al cual se le dió el nombre de cardiolipina, al confirmarse su parecido con el fosfolípido aislado de corazón de res (Benson y Strickland, 1960; Coulon-Morelec y Douce, 1968). Este fosfolípido normalmente se encuentra en muy pequeña cantidad en tejidos fotosintéticos, en donde alcanza un 1% (Roughan y Batt, 1969) y una mayor concentración en tejidos no fotosintéticos, de hasta un 20% (Galliard, 1968). El fosfatidil inositol es otro fosfolípido im-



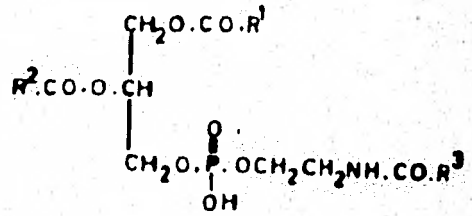
Acido Fosfatídico



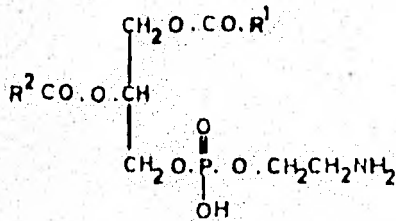
Fosfatidil colina (Lecitina)



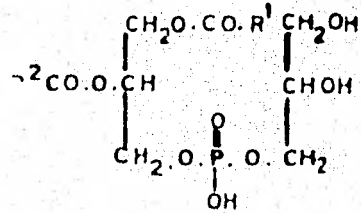
Fosfatidil Serina



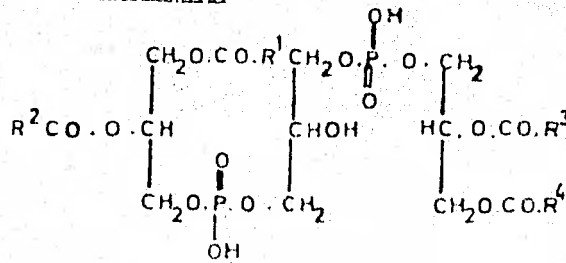
N-Acil Fosfatidiletanolamina



Fosfatidil Etanolamina



Fosfatidil Glicerol



Difosfatidil Glicerol (Cardiolipina)

Fig. 2 FOSFOLIPIDOS MAS IMPORTANTES

portante, al constituir alrededor de un 10% en tejidos no fotosintéticos (Galliard, 1968; Wintermans, 1960; Roughan y Batt, 1969). Otros fosfolípidos presentes en plantas, aunque normalmente más comunes en animales, son los fosfoglicéridos de monoácido o lisofosfolípidos. Se consideran fosfolípidos menores; no obstante parecen ser importantes en cereales (Acker et al, 1968); Wren y Merryfield, 1970; McMurray y Morrison, 1970).

Actualmente se acepta que los fosfolípidos están en las membranas y hay razones para suponer que todos los fosfolípidos de una célula, se encuentran en ellas, de tal manera que el contenido total de fosfolípidos se puede tomar como una medida aproximada de la cantidad de membranas presentes (Williams y Chapman, 1970).

En los fosfolípidos de una planta pueden encontrarse diversos ácidos grasos, los cuales al igual que en los triglicéridos no poseen una distribución fortuita, si bien no se les puede aplicar la teoría de la distribución posicional ya que sólo poseen dos sitios de unión. De tal manera que un mismo fosfolípido puede tener composiciones distintas de ácidos grasos al estar en tejidos diferentes de una misma planta (Van Deenen, 1965). Se ha demostrado que la importancia de los fosfolípidos en la estructura de una membrana, no radica en los detalles de su estructura, por ejemplo la composición de ácidos grasos, sino en la forma de la molécula entera y en su naturaleza bifuncional (Chapman, 1968; Simon, 1974).

Los ácidos grasos más comunes en plantas se observan en la figura 3 y son principalmente de 14, 16 ó 18 átomos de carbono, tanto saturados como el Mirístico, Palmítico o Estéarico, como insaturados, Oleico, Linoleico o Linolénico (Hitchcock y Nichols, 1971; Simon, 1974).

En gran medida, los glucolípidos son muy parecidos a los fosfolípidos, dado que también son moléculas anfipáticas y estructuralmente similares. En la figura 4 se detallan las estructuras de los principales glucolípidos. Estos compuestos son importantes principalmente en tejidos fotosintéticos, en donde llegan a constituir hasta un 80% como en el caso de la espinaca

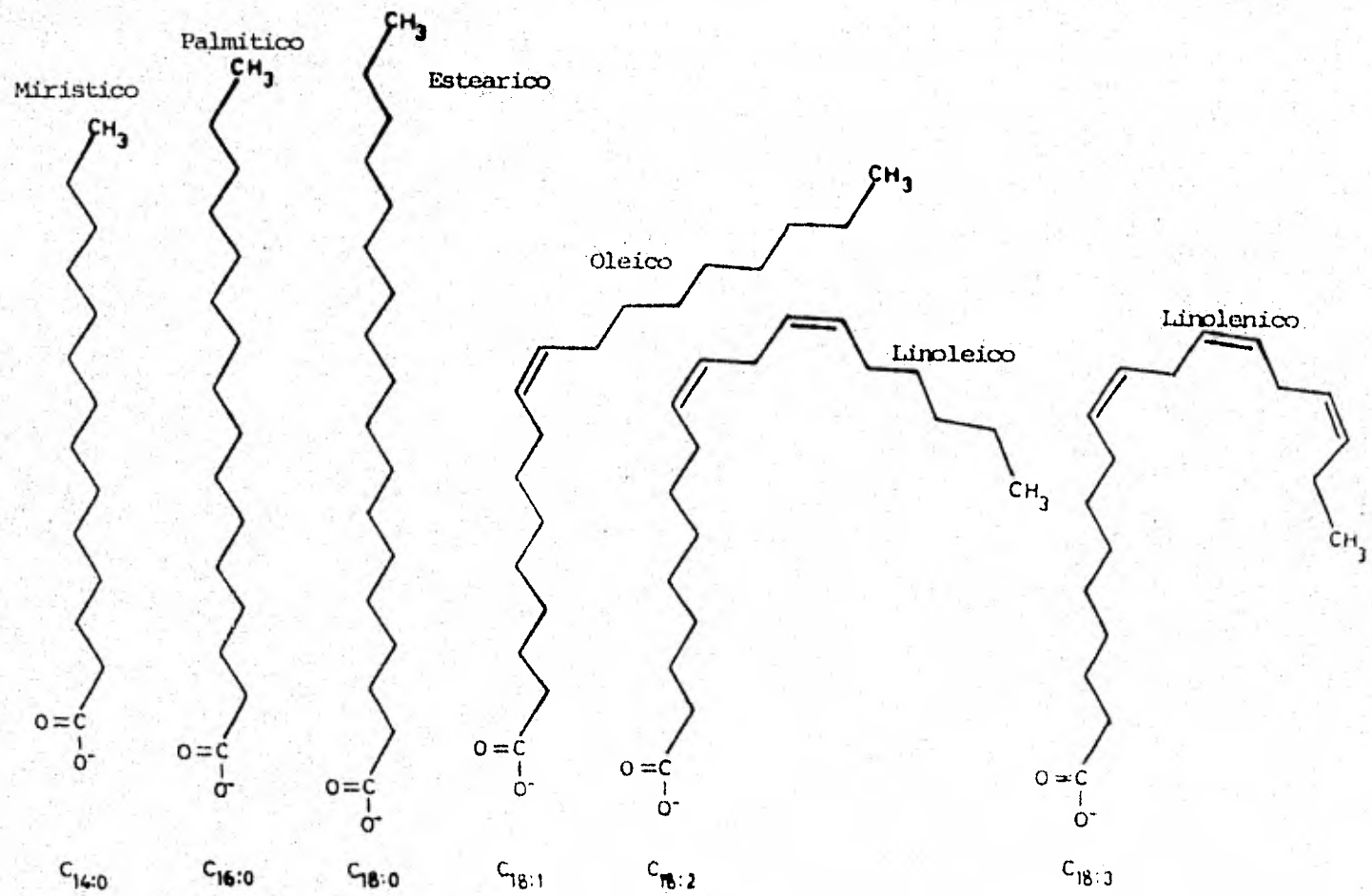
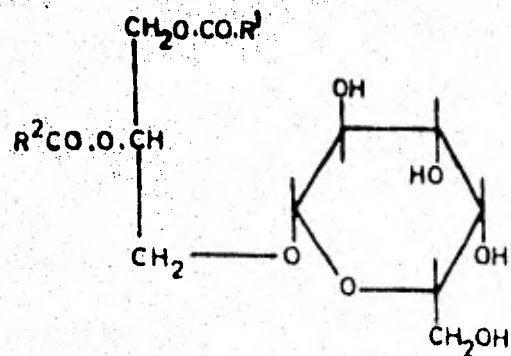


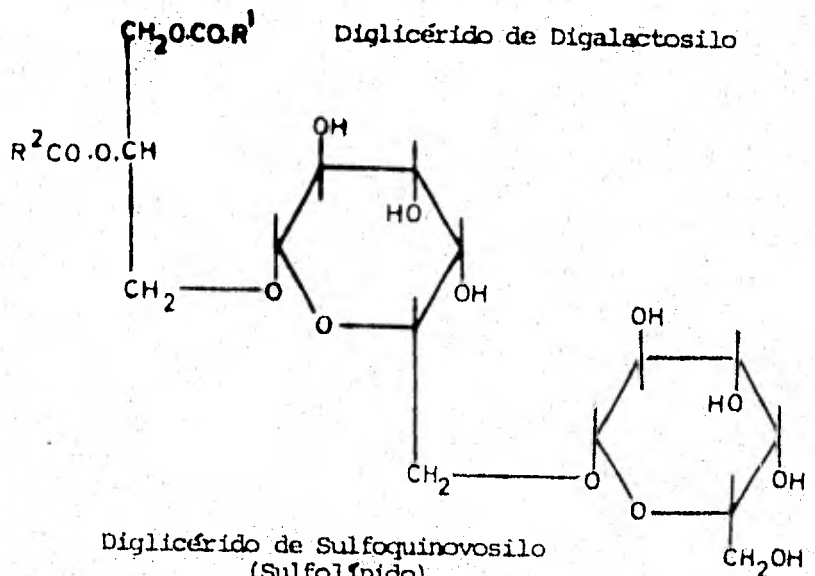
Fig. 3

PRINCIPALES ACIDOS GRASOS DE PLANTAS

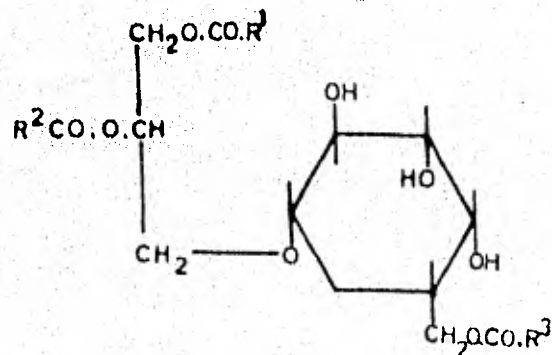
Diglicérido de Monogalactosilo



Diglicérido de Digalactosilo



Diglicérido de 6-O-Acyl Monogalactosilo



Diglicérido de Sulfoquinovosilo (Sulfolípido)

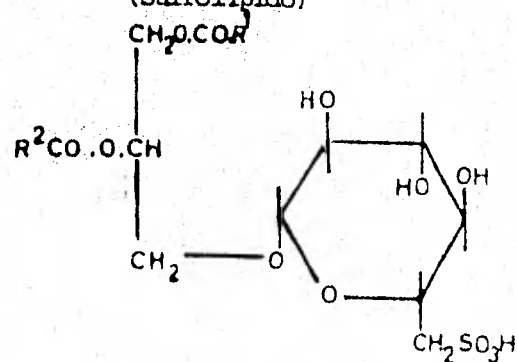


Fig. 4 GLUCOLIPIDOS Y SULFOLIPIDOS

(Wintermans, 1960). Comprenden principalmente a los diglicéridos de mono y digalactosilo, cuyo aislamiento se realizó originalmente de la harina de trigo (Carter et al, 1961, b), caracterizándose a partir de entonces en un gran número de tejidos vegetales como son hojas (Wintermans, 1960), frutos (Galliard, 1968), semillas (Wolff, 1966), flores (Thompson, 1968) etc. En estudios en donde se inhibía la síntesis de proteínas por los cloroplastos, se observó que también se inhibía la síntesis de los glucolípidos (Bishop y Snillie, 1970). Este hecho los distingue de los fosfolípidos, cuya síntesis se efectúa en el citoplasma (Hitchcock y Nichols, 1971). Por otra parte, se ha encontrado que algunas plantas tienen cantidades mínimas de diglicéridos de trigalactosilo (Benson et al, 1958; Allen et al, 1966).

Los sulfolípidos normalmente se agrupan con los glucolípidos, debido a la presencia del azúcar en su estructura (fig. 4). Los sulfolípidos vegetales se distinguen de los de origen animal, por el hecho de que el átomo de azufre está directamente unido al carbono 6 del azúcar, por lo cual es un ácido sulfónico más que un éster sulfato como en los animales. Su aislamiento y caracterización fue llevada a cabo primeramente por Benson et al (1959). A pesar de encontrarse en una gran concentración en tejidos fotosintéticos (Benson et al, 1959), su papel aun no se ha determinado.

Los poliisoprenoides comprenden a moléculas de naturaleza lipídica tales como carotenoides, plastoquinonas y algunos componentes de las clorofilas. Los dos primeros tipos de compuestos han sido aislados de membranas vegetales en diversas ocasiones (Abdelkader et al, 1969; Galliard, 1968; Keenan et al, 1974), pero a diferencia de los tejidos animales, siempre en cantidades muy bajas. Lo que los distingue de una manera clara de los demás lípidos, es su baja tasa de síntesis y metabolismo (Nes, 1974). Su función no es del todo clara, pero es probable que tengan un papel estructural en la membrana, estabilizándola de alguna manera, una función análoga a la del colesterol en las membranas animales. En este sentido Butler et al (1970), encontraron que el orden estructural de mem

branas con estructura de bicapa, preparadas de tejido cerebral de res, era estabilizada en el mismo grado tanto por colesterol, de origen animal, como por β -sitosterol de origen vegetal. Además, se ha visto que en la membrana plasmática vegetal, la proporción de esteroides en relación a los fosfolípidos es mucho mayor que en otras membranas vegetales (Keenan et al, 1973). Por lo que respecta a los componentes de las clorofilas, puede decirse que su importancia parte del hecho de que sólo se encuentran en tejidos fotosintéticos (Hitchcock y Nichols, 1971), por lo que es probable que no participen en las funciones características de las membranas fuera de los procesos fotosintéticos.

I.1.2

Proteínas

En muchas membranas, particularmente las de mitocondrias y cloroplastos, las proteínas constituyen la mayor parte en peso seco de aquellas (Benson y Jokela, 1976; Clarkson, 1977). Por lo general, se les considera como periféricas o integrales (Guidotti, 1972; Singer y Nicolson, 1972). Las proteínas periféricas se encuentran débilmente unidas (Singer y Nicolson, 1972) y pueden disociarse de la membrana por métodos suaves tales como la extracción con soluciones salinas o agentes quelantes (Singer, 1974). Normalmente no forman complejos lípido-proteicos (Singer, 1974), siendo por ello de naturaleza fundamentalmente hidrofílica. Como ejemplo de este tipo de proteínas, se pueden citar al citocromo C y a la fosfatasa del ácido fosfoglicólico (Benson y Jokela, 1976).

La mayor parte de las proteínas de la membrana son del tipo integral (Singer, 1974). Pueden solubilizarse por medio de tratamientos energéticos como detergentes o agentes desnaturalizantes. Como están incluidas en la membrana, es muy común la formación de complejos lípido-proteicos (Singer, 1974). Además, tienen una alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos y una ausencia total de puentes disulfuro lo que las hace más flexibles (Benson y Jokela, 1976). Se consideran parecidas a los fosfolípidos en el sentido de que también poseen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas (Clarkson, 1977). Por todo ello, no son muy solubles en soluciones acuosas. Las razones anteriores, aunadas al hecho de que en ocasiones sus

propiedades parecen depender de los métodos de preparación, han complicado la interpretación de las observaciones (Clarkson, 1977). Esto ha sido particularmente difícil en plantas, en donde aun no se ha logrado una preparación de proteínas puras (Benson y Jokela, 1976).

Richardson et al (1963), aislaron membranas de origen animal y extrajeron exhaustivamente todas las enzimas, llamándole al residuo "proteína estructural". Lenaz et al (1968) postularon la existencia de esta proteína estructural en todas las demás membranas de los seres vivos. Sin embargo se ha demostrado que no es así y que en su lugar existe una amplia variedad de proteínas con papel estructural (Guidotti, 1972). La función que las proteínas cumplen en las membranas es muy variable: Pueden intervenir en fenómenos de transporte (Komor y Tanner, 1974; Slayman, 1974), en reacciones enzimáticas (Arron y Bradbeer, 1975) o únicamente tener un papel estructural (Singer y Nicolson, 1972). Como una generalización muy amplia se puede decir que mientras mayor es la actividad metabólica de una membrana, mayor es su cantidad de proteína; esta aseveración se apoya principalmente en el hecho de que las membranas de mitocondrias y cloroplastos tienen, proporcionalmente, un contenido proteico mayor que cualquier otra membrana celular (Clarkson, 1977).

I.I.3.

Otros constituyentes

El agua es otro constituyente de las membranas, aunque no tan estudiado como los compuestos anteriores. De hecho su presencia determina la estructura básica de las membranas, ya que se ha demostrado que es necesario que la membrana tenga al menos un 20% de agua en relación a los fosfolípidos, lo cual equivale a una proporción de 10 moléculas de agua por cada molécula de fosfolípido, para que se establezca el ambiente hidrofílico que estabilizará la organización de los lípidos en la membrana (Luzzati y Husson, 1962). Si el contenido de agua fuera menor que ese límite, la membrana se haría porosa al desorganizarse los fosfolípidos.

El agua no se encuentra en un estado líquido en la membrana, sino en capas ordenadas alrededor de las partes hidrofílicas de lípidos y proteínas.

(Chapman, 1968). Estas capas forman puentes de hidrógeno con esas partes hidrofílicas inmovilizándolas de tal manera que están en un estado semi-líquido-semicristalino sin poder formar hielo, alcanzando una viscosidad 39 veces mayor que el agua líquida (Schultz y Asummaa, 1970; Clarkson, 1977). Este hecho le confiere gran estabilidad a la membrana y probablemente contribuye a sus propiedades de barrera para algunos solutos. Se ha calculado que el agua puede constituir hasta un 30% en peso de la membrana (Simon, 1974; Clarkson, 1977). Por todos estos hechos, han habido autores (Ling, 1973) que han propuesto ideas extremas tales como el que no son los lípidos los que le confieren a la membrana sus propiedades de barrera para algunos solutos, sino estas capas de agua. El papel que tiene el agua en las interacciones que se producen en la membrana será discutido posteriormente (secc. 1.2).

Además del agua, existen otros constituyentes de las membranas que se han aislado en diversas ocasiones, principalmente por Sharon (1974). Estos compuestos son carbohidratos y se hallan unidos a las proteínas, por lo cual se les llama en ocasiones "glucoproteínas". Normalmente se encuentran en pequeñas cantidades en comparación con los otros constituyentes de las membranas y su función no está relacionada con las membranas, sino que más bien sirven como "marcadores" de ellas por lo que no son relevantes en este estudio.

1.2

Estructura de la membrana

El modelo comúnmente aceptado de la membrana es el de Singer y Nicolson (1972), el cual es una modificación del propuesto originalmente por Davson y Danielli (1935). En términos generales, es una doble capa lipídica con proteínas incluidas (fig.5), por lo cual a veces se le llama mosaico fluido. Las interacciones entre los diversos componentes de la membrana, han servido para apoyar a este modelo. Los argumentos que explican estas interacciones son principalmente de tipo termodinámico y esto se debe a que el mismo modelo está apoyado también termodinámicamente (Singer, 1974).

Las interacciones que los lípidos tienen con las proteínas y el agua afectan

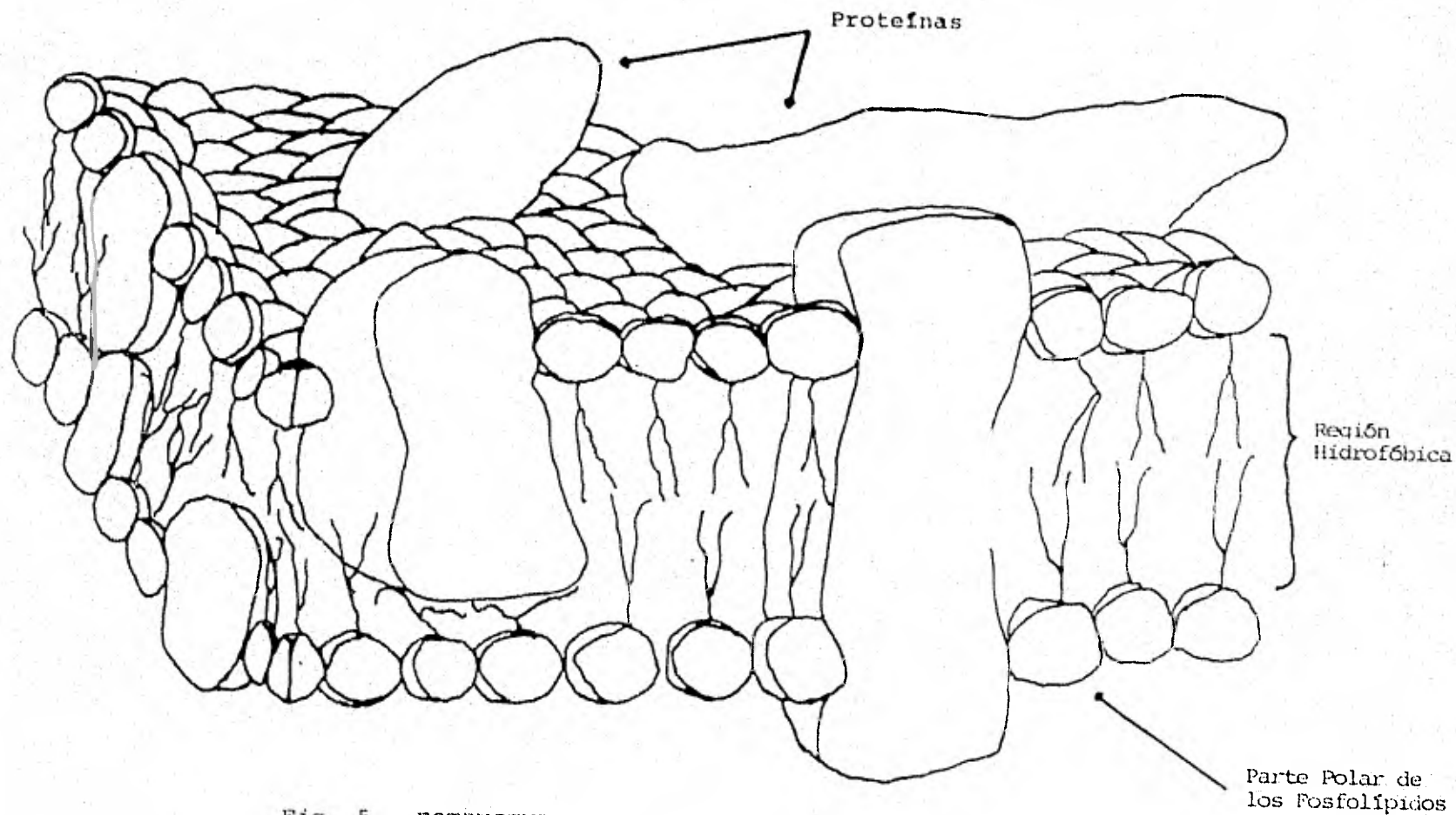


Fig. 5 ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA. ADAPTADO DE SINGER Y NICOLSON (1972) Y CAPALDI (1974).

a las propiedades de las membranas. El entender el mecanismo de estas interacciones permite interpretar correctamente la estructura de la membrana. Los principales tipos de interacciones son 4: Hidrofóbicas, hidrofílicas, electrostáticas y puentes de hidrógeno.

Cuando una proteína se dobla en una solución acuosa, los grupos hidrofóbicos tienden a evitar el contacto con el agua, disminuyendo así la energía libre (Kauzmann, 1959). Esta disminución resulta del aumento en entropía de las moléculas de agua que rodean a la proteína, las cuales se encontraban al principio ordenadas pero al interactuar con esta se desordenan (Kauzmann, 1959). En macromoléculas proteicas, este cambio en energía libre se manifiesta en un alto valor negativo lo cual le confiere una gran estabilidad en solventes acuosos (Benson y Jokela, 1976). Por el contrario, en solventes no acuosos el cambio en energía libre es pequeño y las interacciones hidrofóbicas no son tan importantes (Singer, 1962). Por ello, las proteínas se desdoblan y sufren un cambio conformacional extensivo. De una manera análoga, las interacciones hidrofóbicas contribuyen a la formación de bicapas o micelas por los lípidos polares (Singer, 1971).

Las interacciones hidrofílicas no han sido tan ampliamente reconocidas como las hidrofóbicas, sin embargo se consideran como la tendencia de los grupos iónicos y altamente polares a permanecer en contacto con el agua (Singer, 1971). Estas interacciones le confieren gran estabilidad a la membrana ya que la energía libre total es mínima y requeriría un gran aumento en esta para separarlas del medio ambiente acuoso (Singer, 1971).

Los complejos lípo-proteicos de la membrana poseen muchos grupos iónicos, la mayoría ionizados a pH fisiológico (Benson y Jokela, 1976). Estos grupos por las razones dadas anteriormente, tenderán a estar en contacto con el agua. Se ha visto que las interacciones electrostáticas son relativamente débiles en ambientes acuosos (Tanford, 1954) y sólo tienen importancia en la estructura y estabilidad de la membrana cuando están muy próximos entre sí, como es probable que suceda con las partes hidrofílicas de los fosfolípidos de la membrana (Singer, 1977). Cuando hay contribución de las interacciones electrostáticas a la estabilidad de sistemas micromoleculares, el cam

bio en la fuerza iónica de la solución altera la estabilidad del sistema (Benson y Jokela, 1976).

Los puentes de hidrógeno sólo se forman cuando la distancia interatómica es menor de dos Å (Benson y Jokela, 1976), pero si se llegan a formar le dan una gran estabilidad al sistema. En un medio ambiente acuoso, los puentes de hidrógeno que se formen serán tanto entre moléculas como entre moléculas y agua. En ambos casos el cambio en energía libre es el mismo (Klotz y Farnham, 1968). Esto indica que como se pueden formar enlaces con el agua con mucha facilidad, los puentes de hidrógeno no contribuirán mucho a la estabilidad del sistema en soluciones acuosas. Sin embargo, en el interior de la membrana, es decir en un ambiente hidrofóbico, el papel que desempeñan es crucial para la estabilidad de la membrana (Klotz y Franzen, 1962). Además, los puentes que se forman entre las moléculas de agua y las partes hidrofílicas de las proteínas, ejercen una presión que se ha calculado en varios miles de atmósferas, que ayudan a la estabilidad del sistema (Benson y Jokela, 1976).

Todas estas interacciones han servido para apoyar al modelo de Singer y Nicolson, pero han sido fundamentales dos tipos de evidencias para su aceptación definitiva; en primer lugar, explica porqué en las micrografías electrónicas se observa la apariencia trilaminar característica que se ha llamado unidad de membrana, ya que las regiones hidrofílicas de los fosfolípidos formarían las dos láminas externas, las cuales se tiñen fuertemente y la región hidrofóbica, más clara, entre ambas. Además, en estudios de criofractura, se han observado huecos que se suponen correspondientes a los lugares en donde se encontrarían las proteínas (Hochli y Hackenbrock, 1976). En segundo lugar, las mezclas de fosfolípidos puros adoptan una estructura similar con propiedades bastante parecidas a las de las membranas naturales (Chapman, 1968). Se han sugerido toda una serie de modelos de membranas (Green y Oda, 1961; Robertson, 1964; Benson, 1966; Wallach y Zahler, 1966; Sjöstrand, 1971), aunque todos ellos conservan el patrón básico y sólo difieren en detalles.

1.3

Funciones de los lípidos en las membranas

Las funciones que los lípidos efectúan en las membranas pueden estar relacionadas con la estructura, con permeabilidad y transporte, con la actividad enzimática, con el almacenamiento de energía o con la estabilidad de la membrana a bajas temperaturas.

En el modelo de Singer y Nicolson (1972), no se incluyen detalles concernientes a la distribución de los lípidos en las membranas, asumiendo por lo tanto una distribución uniforme. En los últimos años, se ha acrecentado el interés sobre este aspecto al acumularse evidencia en favor de una membrana asimétrica, tanto en animales (Roelofsen et al, 1971; Cooper y Kirchner, 1971; Woodward y Zwaal, 1972; Zwaal et al, 1973), como en plantas (Radunz, 1972; Billecoq, 1974) e incluso en modelos artificiales de membranas (Michaelson et al, 1973; Huang, 1974). Teóricamente la asimetría estaría dada por los complejos lipoproteicos que se encuentran en la matriz (secc. 1.2). El papel que tiene esta asimetría en la membrana aun no está del todo claro, sin embargo se está efectuando investigación intensiva en este campo, particularmente en la membrana de cloroplastos en donde parece haber una relación estrecha de la asimetría y la fotosíntesis (Miller, 1979).

Un aspecto relacionado con lo anterior, es el hecho de que se han postulado teorías en el sentido de que los lípidos pueden formar capas alrededor de determinadas enzimas o grupos de moléculas con alta actividad metabólica. En este sentido, Schreiber et al (1976) sugirieron, que algunas capas de este tipo podrían rodear al fotosistema II y protegerlo de las altas temperaturas, mientras que Duke et al (1977), sugirieron lo mismo pero para deshidrogenasas mitocondriales provenientes de diferentes vegetales y cuya actividad dependía de la temperatura. Pero en ninguno de estos estudios se proponen mecanismos por los cuales pudieran llevarse a cabo tales efectos y tampoco se realizaron estudios sobre la composición de lípidos, por lo que aun no hay nada definitivo en estas proposiciones.

La idea de que los lípidos están relacionados con la permeabilidad de la membrana se originó hace muchos años en los trabajos de Overton (1900). El observó que los solutos que más rápidamente penetraban en la membrana eran aquellos que poseían grupos hidrofóbicos, por lo cual propuso que la membrana debía tener un componente lipídico y que estaba involucrado en cuestiones de permeabilidad. Sin embargo, el tipo de permeabilidad que había descubierto era pasiva y no fue sino hasta después de algunos años que empezó a ganar aceptación la idea de que algunas sustancias requerían ser transportadas con el consiguiente gasto de energía (Collander, 1959). Como los lípidos tienen una baja constante dieléctrica (Chapman, 1968) y además forman un ambiente hidrofóbico, se requiere un gasto de energía para introducir iones al interior de la célula, para lo cual se han propuesto diversos mecanismos: Rothstein y Gotz (1968) demostraron que los iones son transportados a través de las membranas uniéndose primariamente a los grupos fosfato de los fosfolípidos. En la misma época, Benson et al (1959) demostró también que el transporte de cationes, resultaba de cambios conformacionales de las proteínas de la membrana y por lo tanto de sus grupos cargados negativamente a los cuales se unía al ión. Estudios similares en membranas sintéticas llevaron a Hopfer et al (1970), a concluir que la carga del grupo polar de los fosfolípidos juega un importante papel en el control de la permeabilidad para los iones, estando involucrados solamente los lípidos con carga negativa.

Benson (1963) propuso también una teoría para el transporte de los azúcares, la cual postulaba que la glucosa se epimerizaba a galactosa y reaccionaba con un diglicérido de la membrana, penetrando de esta manera a la célula en donde se liberaba por acción de la β -galactosidasa. No obstante, Chang y Kulkurni (1970) y Rougham (1970) fueron incapaces de confirmar este modelo. Otro mecanismo propuesto por De Grier et al (1968) se basó en observaciones sobre la permeabilidad de liposomas al glicerol, la cual aumenta en relación directa con el grado de insaturación de los ácidos grasos de la membrana. Este resultado y otros obtenidos en estudios en membranas naturales (Van Deenen y De Grier, 1964), indicaron que la permeabilidad de las membranas para no electrolitos solubles en agua depende primeramente

del grado de insaturación y la longitud de la cadena de los ácidos grasos de los lípidos de la membrana. Por esta razón, la membrana del cloroplasto tiene un gran cantidad de ácido linolénico, el cual es altamente insaturado, lo que explicaría su alta actividad de transporte (Hitchcock y Nichols, 1971). En este sentido, Brody et al (1970) al añadir ácidos grasos insaturados, principalmente linolénico, a preparaciones de cloroplastos, observaron efectos pronunciados sobre los cambios de absorción inducidos por la luz, lo que se interpretó como un incremento en la permeabilidad en la membrana de los tilacoides.

En los últimos años se ha acumulado la evidencia sobre el importante papel que juegan los lípidos en relación con las actividades de enzimas localizadas en la membrana de cloroplastos y mitocondrias. Se ha obtenido la mayor parte de la evidencia en mitocondrias animales y ya que las estructuras y funciones de estos orgánulos son lo suficientemente parecidos en plantas y animales, se puede suponer que no hay mucha diferencia entre ambos grupos en este sentido. Se ha sugerido que los glucolípidos que contienen grandes cantidades de ácido linolénico son cofactores esenciales en el transporte de electrones en cloroplastos (Erwin et al, 1964; Chang y Lundin, 1965; Appelman et al, 1966). Posteriormente se demostró que en este sistema, se sintetizaba solamente el ácido gamma-linolénico pero no su isómero el alfa-linolénico (Kates y Volcani, 1966; Patton et al, 1966).

En mitocondrias se ha visto que los sistemas de transporte de electrones están formados por lípidos y proteínas y al separar a los primeros, la actividad de los complejos disminuye de una forma notoria y sólo se restablece al reagregarle los lípidos (Fleischer et al, 1967). Además, se ha establecido que se requieren los lípidos en tres partes de la cadena de electrones en mitocondrias, de succinato a coenzima Q, de coenzima Q a citocromo C y de citocromo C al oxígeno (Green y Fleischer, 1963). Este hecho ha sido interpretado por los autores como una necesidad de un medio con una baja constante dieléctrica. Posteriormente, Green y Fleischer (1964) determinaron que no importa la naturaleza de los lípidos reinsertados con la única salvadad de que tengan un carácter poco ácido. Los lípidos no sólo son esen-

ciales en estos organoides, sino que también se ha visto que si se extraen los lípidos de un extracto microsomal de hígado de rata, este pierde su actividad y la recupera al reagregárselos (Jones et al 1969). Todo esto indica que los lípidos son esenciales para la actividad enzimática, pero de ninguna manera que lo hagan formando capas alrededor de las enzimas tal y como se dijo anteriormente en las teorías descritas, las cuales no tienen todavía un fundamento sólido.

Diversos grupos de investigadores han mostrado que los ácidos grasos asociados con los lípidos mitocondriales de las plantas con resistencia a las heladas son normalmente más insaturados, que los de plantas sensibles (Lyons et al, 1964; Raison et al, 1971). Kuiper (1970) demostró la existencia de tales diferencias en grupos de hojas de alfalfa con distinto grado de sensibilidad al frío. Sin embargo, Wilson y Crawford (1974a) compararon los ácidos grasos de hojas de siete especies de plantas resistentes al frío, con seis especies sensibles, sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos, si acaso un leve exceso de ácido linolénico en las resistentes. En un trabajo posterior, Wilson y Crawford (1974b) postularon que si había diferencias, estas se darían sólo en los ácidos grasos de los fosfolípidos más que en los lípidos totales. Por otra parte, en el proceso de aclimatación de plantas sometidas por diversos periodos a temperaturas bajas, sin llegar a la congelación, se ha observado un incremento en la síntesis de fosfolípidos en corteza de árboles (Simionovitch et al, 1968, 1975; Singh et al, 1975). Sin embargo, este tipo de cambios no son generales ya que en otros estudios no se ha observado este fenómeno (Quinn y Williams, 1978). Todos estos resultados sugieren una relación directa entre lípidos y resistencia a bajas temperaturas; ni aun en donde no está clara la relación puede descartarse, como en el proceso de aclimatación. Por otra parte, continúa sin aclararse si los cambios en la saturación de los ácidos grasos es un factor primario en la resistencia al frío o si simplemente reflejan otros cambios más básicos en la composición de los lípidos.

El papel que los lípidos tienen en el almacenamiento de energía será discutido posteriormente (secc. 1.7).

1.4

Estructura del grano de trigo

El trigo es un miembro de la familia de las gramíneas. Su fruto consiste en una sola semilla o cariósipide y está formada por el pericarpio, la cubierta del fruto y la semilla propiamente dicha, la cual está fusionada al pericarpio. La semilla consiste a su vez de testa o cubierta de la semilla, el embrión y el endospermo (fig. 6).

El pericarpio está formado por varias capas de células de paredes gruesas impregnadas de lignina y cutina. La testa consiste en una o dos capas de células, a menudo muy pigmentadas, que son las que le dan el color al grano. Por debajo de la testa y rodeando sólo al endospermo, se encuentra la capa de aleurona, la cual consta, de una sola capa de células de paredes gruesas. Esta capa es la única parte viable del endospermo, aunque sus células no se dividen; su característica más distintiva son los gránulos de aleurona, de los cuales se hará una discusión más adelante. Por debajo de la aleurona se encuentra el endospermo almidonoso, con células de paredes delgadas y cuyo contenido es fundamentalmente almidón y proteína. El primero se encuentra en forma de gránulos densamente empacados, con la proteína llenando los espacios entre estos. Este tejido forma hasta un 70% del peso total de la semilla.

Adyacente al endospermo se encuentra el embrión, el cual originará a la nueva planta. Este consiste de una raíz llamada radícula y un tallo o plúmula embrionarios, cubiertos por envolturas protectoras llamadas coleorriza y coleoptilo respectivamente. Asociado con el embrión está el escutelo, situado entre el embrión y el endospermo y considerado como un cotiledón modificado. Este, al germinar el grano, tiene la función de movilizar las reservas alimenticias almacenadas en el endospermo y transmitir las al embrión. El escutelo también contiene reservas utilizadas en las primeras horas de la germinación (Tavener y Laidman, 1972a).

1.4.1.

Gránulos de aleurona

Estos gránulos son el rasgo característico de la capa de aleurona. En

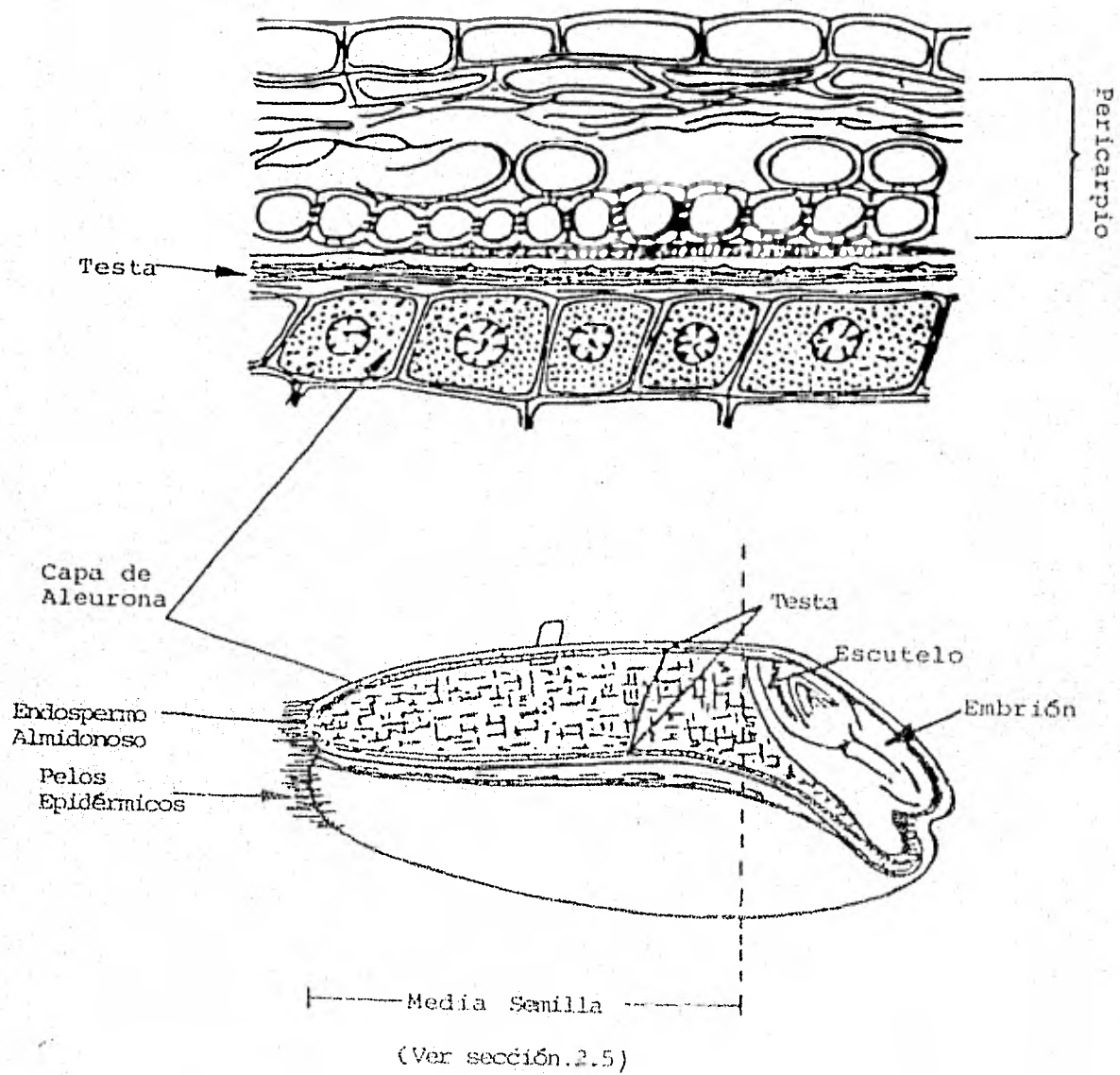


Fig. 6 ESTRUCTURA DEL GRANO DE TRIGO.

ellos se almacenan proteínas, carbohidratos, minerales en forma de fitina y algo de lípidos. Se encuentran en gran número en el citoplasma de las células de la aleurona y están rodeados por una membrana. Al parecer, se originan del depósito de todos estos materiales dentro de la célula, lo que provoca que poco a poco vayan adquiriendo una membrana propia. Es por ello que se les considera como vacuolas especializadas. Al germinar la semilla, todos los materiales almacenados en los gránulos se utilizan, pero las membranas se fusionan produciendo grandes vacuolas (Colborne, 1974). El papel que tienen las hormonas en el proceso de utilización de las reservas será discutido posteriormente (secc. 1.7).

Rodeando a los gránulos de aleurona, se encuentran numerosos orgánoides llamados esferosomas. Estos, son los principales almacenes de lípidos de la capa de aleurona, siendo capaces de llevar a cabo síntesis de lípidos (Semanedi, 1967). Los principales lípidos que se encuentran en los esferosomas son triglicéridos, con sólo una pequeña proporción de fosfolípidos (Jacks et al, 1967; Morrison, 1979). Durante la germinación, el tamaño y el número de los esferosomas disminuye notablemente (Colborne, 1974).

1.5 Composición química de la semilla de trigo

Los principales componentes del grano de trigo son almidón, lípidos y proteínas, más una pequeña cantidad de minerales. La composición del grano entero difiere de la composición de la aleurona, tal y como se ve en la siguiente tabla:

Composición porcentual del trigo*

	Carbohidratos (como almidón)	Proteínas	Lípidos	Minerales
Grano entero	57-62	11-13	2-4	0.3-0.7
Aleurona**	0	20	6	67

*Tomada de Kent (1975).

**Esta composición es de la aleurona con el pericarpio y la testa.

Los minerales están presente principalmente en la forma de sales insolubles de potasio, calcio, magnesio y hexafosfoinositol, a los que se les llama fitina (Hay, 1942; Lee y Underwood, 1948).

1.6

Los lípidos del trigo

La mayor parte de los análisis de lípidos de trigo se han realizado en harina de trigo. Esto es comprensible debido a la importancia que el trigo tiene como alimento en el mundo entero y la que los lípidos tienen en el almacenamiento y en el proceso de fabricación de alimentos. Por el contrario, se han realizado muy pocos estudios sobre la composición de las diversas partes del grano por separado. Estos, se han realizado en embrión (Mecham, 1971; Acker, 1974), aleurona (Colborne y Laidman, 1975; Varty y Laidman, 1976), endospermo (Colborne y Laidman, 1975) y en grano entero (Nelson et al, 1963; Graveland, 1969; Morrison, 1979).

Los triglicéridos constituyen del 50 al 60% de los lípidos de la aleurona (Nelson et al, 1963), siendo metabolizados desde las primeras horas de la germinación (Tavener y Laidman, 1972b). Los fosfolípidos más abundantes son la lecitina y el fosfatidil etanolamina (Fisher et al, 1964; McKillican y Sims, 1964; Graveland, 1968). Sin embargo, la lisofosfatidil colina se encuentra en altos niveles debido a su interacción con el almidón (Acker y Schmitz, 1967). El ácido fosfatídico se ha encontrado en altas cantidades, (aproximadamente 10%) (Mason y Johnson, 1958), pero es muy probable que sea un artefacto (secc. 1.1.1).

Además de estos lípidos mayores, se han encontrado una gran cantidad de otros lípidos menores tales como glucolípidos (McKillican, 1964), sulfolípidos (Wren y Szczerpanowska, 1965), otros fosfolípidos como fosfatidil inositol (Faure y Coulon-Morelec, 1957), fosfatidil serina (Graveland, 1968) etc. Morrison (1979) ha reportado todos los lípidos identificados en el trigo hasta la fecha.

Proceso de la germinación

En botánica se define a la germinación como el conjunto de procesos que causan que una semilla quiescente con un bajo contenido de agua, muestre un aumento en la actividad metabólica general y el embrión inicie la formación de una nueva planta. Sin embargo, durante esta fase ocurre muy poca movilización de material de reserva. Para nuestros propósitos consideraremos que la germinación incluye los primeros días del crecimiento de la plántula.

La primera fase de la germinación es la imbibición con agua (Schull, 1916). Durante esta fase, el contenido de agua se incrementa rápidamente al hidratarse los distintos tejidos de la semilla, siendo este un proceso enteramente físico e independiente de la viabilidad de esta. Eventualmente alcanza una fase de meseta a la cual le sigue, en las semillas viables, un marcado aumento de peso a la par con el crecimiento de la plántula. Durante todo este proceso, las semillas llevan a cabo funciones catabólicas y anabólicas al mismo tiempo. Debido fundamentalmente a que las semillas están parcialmente diferenciadas, la mayor parte de las actividades catabólicas se localizan en tejidos de almacenamiento, como por ejemplo el endospermo (secc. 1.4). Por el contrario, los procesos anabólicos se localizan principalmente en el eje embrionario. En todo este tiempo y hasta la salida de las primeras hojas de la plántula, esta es un organismo heterótrofo.

Los eventos bioquímicos de la germinación, así como su control, han sido objeto de estudio en muchas ocasiones (Varner et al, 1965; Ching, 1972; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975), por lo que a continuación se tratará en forma resumida el metabolismo del endospermo en la germinación y en particular el desarrollo y control de la actividad enzimática en la capa de aleurona de cereales.

Metabolismo de lípidos. Las reservas de triglicéridos de los cereales se encuentran en los esferosomas principalmente (Jones, 1969; Jelsena et al, 1977) aunque se piensa que una parte de los lípidos se encuentran asocia-

da con la fitina en los gránulos de aleurona (Jacobsen et al, 1971). Durante los primeros estadios de la germinación, los triglicéridos sirven como la mayor fuente de energía (Tavener y Laidman, 1972a) siendo movilizados progresivamente en este periodo. Se ha visto que existen dos reservas de triglicéridos en la aleurona. Una de ellas, la mayor, se metaboliza por efecto de un factor producido por el embrión (Tavener y Laidman, 1972b). Este factor no puede ser reemplazado por ácido giberélico (AG_3) pero sí por compuestos nitrogenados tales como hidroxilamina o glutamina. Es capaz de inducir la actividad de lipasas en el tejido de aleurona en presencia de auxinas y de retardar o inhibir la degradación de la otra reserva de triglicéridos (Tavener y Laidman, 1972b). Esta última, es a su vez movilizada por un factor presente en el endospermo almidonoso y es sustituido exactamente por las citocininas sintéticas cinetina o benziladenina a concentraciones fisiológicas (Tavener y Laidman, 1972a).

La actividad incrementada de las lipasas coincide con la activación de las vías metabólicas de los ácidos grasos. Las giberelinas, endógenas o exógenas, inducen a las enzimas del ciclo del glioxilato y de Beta-oxidación (Doig et al, 1975). Esta inducción es inhibida o reducida por inhibidores de la síntesis de ARN o proteínas (Tomos y Laidman, 1979), lo que indica una síntesis de novo. Se ha demostrado que en la aleurona de cebada las enzimas del ciclo del glioxilato se encuentran en glioxisomas unidos a la membrana (Jones, 1973). En endospermos de higuera, las enzimas del ciclo de Beta-oxidación están en vesículas unidas también a la membrana (Cooper y Baevers, 1969). Es posible que esto sea general para los demás cereales.

Bucet (1949) fue el primero en reportar movilización de fosfolípidos durante la germinación. Al igual que en el caso de los triglicéridos, los fosfolípidos son activamente degradados al mismo tiempo que en la plántula aumenta la concentración de estos (Colborne, 1974). Han sido pocos los estudios realizados en la capa de aleurona sobre metabolismo de fosfolípidos, sin embargo los resultados de todos ellos y su relación con el metabolismo de membrana serán discutidos posteriormente (secc. 1.9).

Metabolismo de carbohidratos. El endospermo almidonoso es el principal almacén de reservas tanto proteicas como de carbohidratos. Por ello el desarrollo primario de la semilla requiere la degradación de estas reservas. Yomo (1960) y Paleg (1960) independientemente demostraron que la actividad amilolítica sobre el endospermo puede reemplazarse por AG_3 . Esta propiedad se ha demostrado en avena, trigo (Paleg et al, 1962) y arroz (Ogawa e Inamura, 1965). Radley (1967) demostró que en las primeras etapas de la germinación, el escutelo producía giberelinas, siendo reemplazado al tercer día por el eje embrionario. Se ha demostrado que la capa de aleurona es el único tejido que responde al AG_3 (McLeod y Millard, 1962; Briggs, 1964). Además, se ha visto que se inducen dos tipos de amilasas: La primera está presente en forma inactiva en el grano sin germinar, la Beta-amilasa (Rowell y Goad, 1962); la segunda, y la más importante, es la alfa-amilasa la cual es sintetizada de novo y secretada al medio. Esta inducción se ha comprobado tanto en cebada (Filner et al, 1969) como en trigo (Collins et al, 1972). Al igual que en el caso de los triglicéridos, también aquí se requiere la presencia de una citocinina para que el AG_3 tenga un efecto máximo (Eastwood et al, 1969). Por otra parte, se ha demostrado que el ácido abscísico (AAB) inhibe la síntesis de alfa-amilasa estimulada por AG_3 (Chrispeels y Varner, 1966, 1967a; Jacobsen, 1973). Este efecto es revertido por etileno, siempre y cuando se aplique simultáneamente con las otras hormonas, tanto en aleurona de cebada (Jacobsen, 1973) como de trigo (López et al, 1978). Aparte de la alfa-amilasa, otras enzimas son inducidas también por el AG_3 , tales como la proteasa (Filner et al, 1969), maltasa (Briggs, 1963), Beta-1,3 glucanasa (Pollard, 1969) y, en menor proporción, fosfatasa ácida, fitasa, varias glucosidasas y ribonucleasa (Trewavas, 1976). En muchos de estos casos, también se aumenta la liberación al medio por lo que es probable que haya un efecto de la hormona sobre la permeabilidad de membrana. La manera en la cual estas proteínas son excretadas ha producido una controversia sobre el modo de excreción. Este aspecto será discutido posteriormente (secc. 1.9).

Metabolismo de proteínas. Las proteínas de reserva que se encuentran principalmente en el endospermo almidonoso, son también degradadas en las pri-

neras etapas de la germinación. La mayor parte de la actividad proteolítica se origina por acción del AG_3 sobre la capa de aleurona (Rowell y Goad, 1962) la cual es sintetizada de novo (Jacobsen y Varner, 1967a). Además se ha sugerido que las proteasas también tienen una acción secundaria sobre la liberación de Beta-amilasas del endospermo almidonoso (Rowell y Goad, 1964).

Metabolismo de minerales. Durante la germinación, las reservas minerales de la aleurona (secc. 1.4) se degradan y contribuyen al desarrollo de la plántula. No se ha comprobado que el AG_3 estimule la degradación de estas reservas en cebada (Srivastava, 1964), mientras que en trigo se ha comprobado que algunos compuestos nitrogenados tales como glutamina o hidroxilamina, en presencia de auxinas, incrementan la degradación de estas reservas (Eastwood y Laidman, 1971b). Además, la liberación de iones es promovida por un factor que se puede sustituir por AG_3 (Eastwood y Laidman, 1971b; Jones, 1973). Por otra parte se ha demostrado que la imbibición por sí sola es capaz de aumentar la degradación de las reservas (Peers, 1953).

1.8

El Sistema de Endomembranas

Se ha postulado que la membrana nuclear, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, algunas vesículas y la membrana plasmática o plasmalema forman una unidad continua y se hallan interconectados entre sí (Bracker et al, 1971; Morré, 1975; Morré et al, 1971a). Para apoyar esta proposición se ha recurrido a dos tipos de evidencias: Una dada por micrografías electrónicas y la otra por similitudes en cuanto a función y estructura de los elementos que forman el sistema. La primera de ellas, al permitir detectar continuidades directas entre los elementos, ha servido para apoyar o rechazar a un presunto elemento; sin embargo no todos los autores que trabajan con este tipo de evidencias efectúan cortes en serie, la cual es la mejor manera de trabajar (Hanke, 1977), lo que ha producido interpretaciones erróneas. Esto es particularmente difícil en tejidos vegetales, en donde la presencia de la pared celular interfiere con muchos tipos de estudios.

Las similitudes entre los elementos del sistema, requieren un origen común y, al mismo tiempo, de elementos de transición, los cuales posean características intermedias entre el retículo endoplásmico rugoso (RER) por un lado y el plasmalema o el tonoplasto por el otro. De tal manera que se han propuesto como elementos de transición al retículo endoplásmico liso (REL), al aparato de Golgi y a algunos tipos de vesículas (Morré et al, 1971a).

La membrana externa del núcleo se ha considerado un elemento representativo del sistema de endomembranas desde el punto de vista de las similitudes con el RER (Morré et al, 1971), entre ellas la presencia de ribosomas y su continuidad estructural. Sin embargo, aun no se ha demostrado una transferencia de vesículas entre ambos. Esta transferencia se ha observado pero entre el RER y el aparato de Golgi (Falk y Kleinig, 1968; Bracker et al, 1971; Morré et al, 1971b), al cual se fusionan estas vesículas.

El RER consiste de una serie de membranas dobles aplanadas, llamadas en ocasiones cisternas, recubiertas por ribosomas sobre la superficie en contacto con el citoplasma. Es el mayor sitio de síntesis de proteínas en el sistema de endomembranas (Siekevitz et al, 1967). Las características específicas del RER varían con el organismo, etapa de desarrollo y estado metabólico de la célula (Porter, 1961) e incluso difieren entre regiones de una misma célula (Leskes et al, 1971a,b). Normalmente se encuentra más desarrollado en células especializadas en secreción. Aparte de su papel en la síntesis de proteínas, está también involucrado en la síntesis de fosfolípidos, ya que posee todas las enzimas necesarias para ello (Getz et al, 1968; Bracker y Grove, 1971). Desde este punto de vista, el RER es la fuente principal de membrana.

El REL se distingue principalmente por su carencia de ribosomas. Es muy parecido al RER en su composición (Eriksson y Dallner, 1972), debido principalmente al hecho de que el REL se sintetiza primero como RER o se deriva de este (Higgins y Barnett, 1971). Comparte muchas funciones con el RER excepto la síntesis de proteínas (Porter, 1961).

Aparte de la transferencia de vesículas entre la membrana nuclear y el aparato de Golgi, mencionada anteriormente, hay también una asociación cercana entre el RE principalmente liso y el aparato de Golgi que se manifiesta en una transferencia de vesículas (Morré et al, 1971a; Morré y Mollenhauer, 1974) y una continuidad estructural y funcional entre ambos (Siekevitz et al, 1967; Morré y Mollenhauer, 1974). Estas vesículas son importantes no sólo porque forman al aparato de Golgi, sino porque muchas de ellas contienen productos de excreción, los cuales se acumulan temporalmente en el aparato de Golgi, siendo después descargados otra vez como vesículas que se fusionan con el plasmalema y vacían su contenido al exterior. En este proceso, contribuyen a la formación o recambio de membrana. Como las propiedades del plasmalema y el RER son diferentes (Morré y Mollenhauer, 1974) se ha sugerido que el aparato de Golgi tiene un papel en la diferenciación de la membrana. Esto está apoyado en el hecho de que las propiedades del aparato de Golgi son intermedias entre el plasmalema y el RER (Grove et al, 1968; Morré y Mollenhauer, 1974). De tal manera que se establecería un flujo de membrana entre estos componentes. Este flujo ha sido confirmado por estudios de incorporación de precursores radioactivos de membrana (Morré, 1970).

Las vesículas producidas por el RER, que están en mucha mayor cantidad que las producidas por la membrana nuclear (Morré y Mollenhauer, 1974) son importantes al dar continuidad estructural al sistema de endomembranas. El proceso de excreción mencionado para estas, se ha sugerido como el usual para las enzimas hidrolíticas inducidas por AG_3 en la aleurona, pero se ha rebatido esta proposición (secc. 1.9).

El plasmalema es el último elemento de transición. Como se ha visto, deriva del aparato de Golgi y posiblemente de algunas vesículas del RER que lleguen directamente al plasmalema. Esta continua fusión de vesículas, provocaría un exceso de membrana si no se contrarresta de alguna manera. Se han sugerido algunos mecanismos para "descargar" el exceso de membrana (Whaley et al, 1964, 1970; Tomos y Laidman, 1979). Uno de ellos propone que la membrana forma dobleces, posibilidad también sugere-

rida en un trabajo de Vigil y Rudat (1973). Es posible también que la membrana se reabsorba en los esferosomas pegados al plasmalema o que éste forme vesículas y las reintegre a la circulación. Es posible que los tres procesos ocurran, aunque aparentemente el primero tiene menos apoyo experimental.

1.9 El control hormonal del desarrollo y metabolismo de la membrana

Los trabajos de Yano (1960) y Paleg (1960) provocaron una investigación intensiva sobre el modo de acción del AG_3 . El primer hecho relevante descubierto fue que este actúa únicamente sobre la capa de aleurona (McLeod y Millard, 1962; Briggs, 1964). Esto posibilitó aun más la investigación. Un aspecto importante de la acción del AG_3 es el efecto que tiene sobre el cambio de expresión génica. El AG_3 promueve la síntesis de novo de varias hidrolasas como alfa-amilasa y proteasa tanto en cebada (Filner et al, 1969) como en trigo (Collins et al, 1972). En el caso de la alfa-amilasa se ha demostrado que el AG_3 incrementa los niveles de ARN mensajero traducible (Higgins et al, 1976) e induce un incremento en la incorporación de adenina radioactiva en el poli-A del ARN (Jacobsen y Zwar, 1974). Sin embargo, el punto real de la acción de la hormona, modificación transcripcional, post-transcripcional, traduccional o post-traduccional, aun se desconoce.

Por otra parte, el AG_3 aumenta la tasa de liberación de un gran número de enzimas de la capa de aleurona, tales como la alfa-amilasa (Chen y Jones, 1974a; Firm, 1975; Gibson y Paleg, 1975), proteasa (Gibson y Paleg, 1976), beta-1,3 glucosidasa (Taiz y Jones, 1970), ribonucleasa (Chrispeels y Varner, 1967b), fosfatasa ácida (Ashford y Jacobsen, 1974) etc. Por ello se ha involucrado al sistema de endomembranas en general y al RE en particular en este proceso. Sin embargo, la relación entre ambos y el AG_3 aun está en controversia.

En 1964, Paleg y Hyde reportaron que el RE proliferaba dentro de las 24 horas siguientes a la aplicación de AG_3 en aleurona de cebada. Posterior

mente Jones (1969a) reportó que la proliferación ocurría dentro de las dos horas siguientes a la aplicación de la hormona en cebada. Vigil y Rudat (1973) confirmaron estos resultados. En estos últimos trabajos se reportaba además, un incremento en el número de glioxisomas. Vigil y Rudat (1973) observaron también que 10 horas después de la aplicación de la hormona, el RE producía gran cantidad de vacuolas que se fusionaban con el plasmalema. Sin embargo, todos estos resultados fueron cuestionados cuando se observó que en trigo esto no sucedía y que la proliferación del RE únicamente dependía de la imbibición (Laidman et al, 1974; Colborne et al, 1976; Varty y Laidman, 1976). Estas conclusiones tan diversas podrían haberse explicado como indicadoras de una diferencia interespecífica, pero los trabajos en cebada presentan muchas deficiencias. Estos han sido criticados sobre la base de que ninguno de ellos incluyó un control (Laidman, 1980), esto es, no se efectuaron incubaciones sin AG_3 , sino que el tejido imbibido tomado antes de la aplicación de la hormona fue el control. Además, se aduce (Laidman, 1980) que las diferencias entre las micrografías del control y el tejido experimental, particularmente en el caso de Jones (1969a), son mínimas. Por otra parte, los resultados en trigo han sido confirmados recientemente (Buckhout et al, 1981) aunque en este trabajo se hace notar que el incremento en la cantidad de RE inducido por la imbibición, aproximadamente el doble, es del mismo orden que el reportado recientemente por Jones (1980). No obstante las discrepancias anteriores los dos grupos coinciden en la vesiculación del RE por efecto del AG_3 a largo plazo, al final del segundo día de germinación y en el aumento en el número de glioxisomas.

Aparte de esta evidencia estructural, también ha habido controversia en la evidencia bioquímica. Las membranas del RE son particularmente ricas en fosfatidil colina o lecitina (Getz et al, 1968), lo cual sirvió para diseñar un procedimiento para el uso de colina radioactiva como marcador de los fosfolípidos del RE (Nagley y Hallinan, 1968). En este estudio se vió que si se administraba colina radioactiva a hígado de rata por 30 min., ésta se incorporaba en su totalidad a la lecitina del RE. Este hecho se probó en aleurona de cebada, observando que el AG_3 aumenta la incorpora-

ción de colina de 4 a 8 veces, a partir de las 4 horas siguientes a la aplicación de la hormona y alcanzando un máximo a las 10 horas (Evins y Varner, 1971). Posteriormente Koehler y Varner (1973), reportaron resultados similares de incorporación de fosfato inorgánico radioactivo como precursor de fosfolípidos, aunque no hubo efecto sobre los niveles de fosfolípidos totales ni sobre la incorporación de acetato radioactivo en esto. Firm y Kende (1974), cuestionaron estos hechos al encontrar que el AG_3 no afecta la incorporación de glicerol tritiado en los fosfolípidos de cebada, ni los niveles totales de estos. Ambos resultados fueron confirmados posteriormente en trigo (Laidman et al, 1974b; Varty y Laidman, 1976). Además se encontró que las incubaciones prolongadas con AG_3 provocaban un descenso en los niveles totales de fosfolípidos, siendo esto una confirmación de los resultados adicionales de Firm y Kende (1974). Por ello, en lugar de una estimulación de la síntesis de fosfolípidos, se sugirió un efecto del AG_3 sobre el recambio de estos (Varty y Laidman, 1976). En esta ocasión las críticas sobre el sistema en cebada se centran sobre el método de extracción y purificación usado por Varner y su grupo (Tomos y Laidman, 1979; Laidman, 1980). Ellos usaron una mezcla de metanol-cloroforno para la extracción y una solución salina acuosa para la purificación; ambos métodos tienen infinidad de inconvenientes (secc. 2.9). Además en los experimentos de incorporación de fosfato (Koehler y Varner, 1973), una gran parte de la radioactividad se recuperó en la fracción de los organoides, por lo cual es posible que se haya medido radioactividad que no correspondía a fosfolípidos.

La hipótesis de la estimulación de la síntesis de fosfolípidos por AG_3 fue apoyada posteriormente por estudios de la actividad de dos enzimas involucradas en la ruta biosintética CDP colina a fosfatidil colina. Esta vía sólo tiene tres enzimas, colina kinasa como enzima soluble, colina fosfato: CTP citidil transferasa y colina fosfato: CDP citidil transferasa. Johnson y Kende (1971) reportaron un incremento en las actividades de las dos últimas enzimas. Ben-Tal y Varner (1974) reportaron también resultados similares, sin embargo ambos trabajos tienen el defecto, muy importante de que no controlaron la concentración de sustrato y por ello los resultados no son confiables. Además, como en el caso citado antes, la ma-

yor parte de la radioactividad se detectó en la fracción de los organoides.

El ácido abscísico (AAB) se ha visto involucrado en este esquema al demostrarse que es capaz de inhibir la formación de glioxisomas inducida por AG_3 (Evins y Varner, 1972; Laidman, 1980) aparte de que produce el mismo efecto que el AG_3 sobre los niveles de lípidos totales en tratamientos prolongados, esto es los disminuye (Varty y Laidman, 1976).

La secreción de las enzimas inducidas por AG_3 , especialmente la de alfa-amilasa y proteasa, se ha explicado también de dos maneras. Una de ellas propone que se secretan a través de una ruta vesicular (secc.1.8); para ello se cuenta con evidencia substancial (Gibson y Paleg, 1972; 1975; 1976; Firm, 1975; Chrispeels, 1976) además del reciente aislamiento de un posible precursor de alfa-amilasa, que también apoya esta proposición (Okita et al, 1979). La otra proposición sugiere un medio de transporte soluble (Jones, 1969a, b). Queda por demostrar cual es la más factible, aunque por ahora las evidencias favorecen a la primera. Un efecto parecido del AG_3 se lleva a cabo sobre las reservas minerales de la aleurona (secc. 1.4 y 1.7), afectando su liberación al medio tanto en cebada (Jones, 1973) como en trigo (Eastwood y Laidman, 1971b) pero no su hidrólisis, la cual está estimulada sólo por la imbibición (Peers, 1953).

La relación del AG_3 con la excreción de enzimas habla de una relación estrecha entre la hormona y las propiedades de la membrana. Además la salida de los iones indica un aumento en permeabilidad de la membrana provocado por la hormona. Este efecto del AG_3 también se ha visto en membranas artificiales formadas por fosfolípidos puros en medio acuoso, en las cuales a bajas concentraciones de AG_3 incrementa la permeabilidad de estas para la glucosa, detectándose además la formación de un complejo con la lecitina (Wood y Paleg, 1972; 1974). Además en estudios similares pero con AAB hay resultados parecidos. Se ha sabido desde hace tiempo que hay una relación entre la apertura de los estomas y el AAB; este es capaz de cerrarlos en minutos, por lo que se ha propuesto que el AAB aumenta la permeabilidad

de la membrana al malato lo que disminuye la turgencia de las células guardias (Dittrich y Raschke, 1977; Van Kirk y Raschke, 1978). Además el AAB tiene un efecto parecido al AG_3 , al aumentar o disminuir la permeabilidad de la membrana de raíces a los iones (Pitman et al, 1974). Este grupo propone que una u otra acción será favorecida dependiendo de las condiciones bajo las cuales la planta creció y la temperatura a la cual se efectúan las mediciones. El AAB también aumenta la permeabilidad al agua en zanahorias (Trewavas, 1976). En membranas artificiales tiene un efecto exactamente igual al AG_3 al aumentar la permeabilidad de la membrana para los solutos, provocando la aparición de múltiples poros en esta (Lea y Collins, 1979).

La maduración de los frutos y los cambios en permeabilidad en la membrana que esta conlleva han sido adjudicados al etileno desde hace algún tiempo (Burg y Burg, 1962; Marei y Crane, 1971). Este cambio se manifiesta en la gran fuga de solutos que ocurre, al mismo tiempo que se produce una gran desorganización estructural, aunque esto ha sido cuestionado al confirmarse que no ocurre en todos los casos (Coombe, 1976). Sin embargo, existe controversia sobre si es la maduración responsable de los cambios en la membrana o si, por el contrario, los cambios de membrana inducidos por etileno posibilitan la maduración.

El etileno tiene un efecto claro sobre la secreción de enzimas. Esto se ha detectado en el caso de la alfa-amilasa en aleurona de cebada (Jones, 1969a; Ho et al, 1977), trigo (López et al, 1978) y celulasa, la cual ayuda a la abscisión en la senescencia (Horton y Osborne, 1967). El papel que el etileno tiene en la senescencia está bien dilucidado (Kende y Hanson, 1977) reportándose además que ocurren cambios en la permeabilidad de la membrana durante este proceso (Ferguson y Simon, 1973; Hanson y Kende, 1975; Suttle y Kende, 1980).

Todas estas evidencias indican una relación clara entre las hormonas y la membrana. Sin embargo la cuestión sobre si tienen un receptor del tipo encontrado en los animales, todavía se discute. Hay pocos ejemplos claros

de un tejido blanco en vegetales, entre ellos se puede citar la elongación de coleoptilos inducida por auxinas (Wright, 1961), la estimulación por AG_3 de la división y elongación celular en la región subapical del meristemo de algunas plantas (Sachs, 1965) y la inducción de enzimas en la capa de aleurona (McLeod y Millar, 1962; Briggs, 1964). Sin embargo, no se sabe si existen receptores específicos en las células para ellas, proponiéndose incluso que las células vegetales no poseen receptores del tipo animal (Kende y Gardner, 1976) o que tal vez funcionan de otra manera (Rappaport, 1980). Un examen de la estructura de todas las hormonas, indica que todas ellas poseen propiedades hidrofóbicas que les confiere una gran solubilidad en solventes orgánicos. Como algunas de ellas poseen también grupos hidrofílicos, es posible que se dispongan sobre la superficie de la membrana con su parte hidrofóbica en los lípidos y la hidrofílica en la fase acuosa. Ya se ha demostrado una interacción entre gibberelinas y lecitina y probablemente sea de este tipo (Wood y Paley, 1974). Queda por demostrarse en las demás hormonas.

Los cambios en permeabilidad de membrana es posible que se manifiesten principalmente en un cambio en la composición de ácidos grasos de esta (secc. 1.3). Estudios de este tipo se han efectuado ya en membranas vegetales. En un estudio en raíces de cebada se observó que la composición de ácidos grasos cambiaba afectando de esta manera a la permeabilidad de la membrana (Jackson y StJohn, 1980). En otro estudio se vio que la temperatura modificaba la composición de ácidos grasos y también cambiaba la permeabilidad de la membrana en raíces de trigo (Ashworth et al, 1981). Incluso en membranas de linfocitos se ha visto que un cambio en la composición de ácidos grasos afectaba las propiedades físicas y la permeabilidad de la membrana (Poon et al, 1981). De tal forma que el cambio en permeabilidad de membrana como consecuencia del cambio en composición de ácidos grasos está bien fundamentado.

2.1 Material de vidrio

Todo el material utilizado fue lavado en un sonicador "Decon" con "Extrán" al 2% exento de fosfatos. El material utilizado para la preparación e incubación del material biológico fue esterilizado en autoclave.

2.2 Disolventes

Todos los disolventes fueron redestilados antes de usarse. A los disolventes saturados con agua se les retiró el exceso de esta.

2.3 Radioisótopos

El cloruro de colina - $[Me - {}^{14}C]$, se obtuvo del Radiochemical Centre, Amersham.

2.4 Material biológico

Para estos estudios se utilizaron granos de trigo de la variedad Potam S-70, cosecha 1977, obtenidas de la Productora Nacional de Semillas (PRONASE). Estas semillas no han sido tratadas con ningún tipo de reactivo.

2.5 Preparación y esterilización de las semillas

Todos los experimentos se efectuaron en grupos de 100 semillas (3.4 g). Como el objetivo de este trabajo era investigar el papel de las hormonas en el control del metabolismo de la membrana y como el embrión es su fuente principal en esta etapa de desarrollo, fue necesario separarlo para poder controlar la concentración de las hormonas en el medio. Este paso se efectuó por medio de un corte transversal con bisturí.

Para prevenir el crecimiento y desarrollo de microorganismos presentes en el pericarpio, las medias semillas fueron esterilizadas superficialmente por infiltración al vacío durante 20 minutos en una solución con cloro activo al 0.15%, preparada por dilución de una solución comercial de hipoclorito de sodio (Cloralex). Para quitar el cloro residual, las semillas fueron enjuagadas con cinco volúmenes de agua destilada estéril y, una vez limpias, colocadas en cajas de Petri con dos hojas de papel filtro Whatman # 1 y 10 ml de agua destilada, todo ello en condiciones de esterilidad, incubándose a 28°C en la oscuridad.

A partir del paso anterior, las medias semillas fueron manipuladas en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar "Veco". El tiempo de imbibición adoptado fue de 48 hrs. aunque en ocasiones fue de 12 ó 24 hrs. Hubo muestras que sólo se dejaron imbibir por dos horas, con el objeto de determinar el nivel basal de fosfolípidos y ácidos grasos en semillas con el menor contenido de agua posible, ya que como se verá más adelante, este es el factor que inicia la síntesis de lípidos en la capa de aleurona.

2.6

Aislamiento de la aleurona

Al terminarse el periodo de imbibición, las medias semillas se volvieron a esterilizar y lavar en las condiciones ya descritas pero sin vacío. La separación del almidón se efectúa haciendo un corte longitudinal en la media semilla y raspando suavemente con el lado no filoso de la hoja de bisturí. Al final se enjuagan cinco veces con agua destilada estéril para quitar los residuos de almidón que pudieran causar una contaminación. Para evitar una posible alteración de la concentración de las hormonas, debido a que se encuentran en una concentración muy baja, se quitó el exceso de agua de las aleuronas con papel filtro antes de transferirlas a los matraces de incubación.

2.7

Incubación de las capas de aleuronas

Se colocaron las aleuronas con 10 ml de medio de incubación en un matraz de

incubación (fig. 7). El medio consistió de una solución amortiguadora de succinato de sodio 5 mM pH 5.8 conteniendo cloruro de calcio 20 mM y 50 $\mu\text{g/ml}$ tanto de estreptomina como de cloramfenicol. En los experimentos con AG_3 , la concentración fue de 1×10^{-6} M. En el caso del AAB fue de 1×10^{-5} M.

Como el etileno es un gas a temperatura ambiente, fue necesario sellar los dos tapones del matraz de incubación con septa de teflón. Para facilitar la manipulación y trabajar con más exactitud, se preparó una solución acuosa saturada a 4°C con etileno, bajo condiciones estériles, usando el dispositivo mostrado en la figura 8. Para conocer la concentración de etileno, se hizo un cálculo siguiendo la ley de Henry sobre la solubilidad de gases en líquidos, la cual establece que la solubilidad de un gas (N) es directamente proporcional a la presión en atmósferas (P) a una temperatura dada:

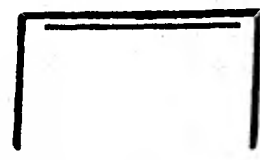
$$\begin{aligned} N &= P K && \text{(K constante de Henry)} \\ P &= 0.763 && K = 17.7 \\ N &= 0.763 \times 17.7 && 13.5058 \text{ V/V} \end{aligned}$$

por lo tanto la concentración de etileno en una solución saturada a 4°C y a 0.763 atmósferas es: $13.5 \times 10^4 \mu\text{l/lt}$.

Se inyectó una alícuota de la solución saturada de etileno en el matraz de incubación, de tal manera que la concentración final de etileno en el matraz fuera de 135 ppm, concentración que recientemente se reportó como la óptima para la acción del etileno en este tejido (López, Arreguín y Varty, 1978). En incubaciones en donde no se requería la presencia del etileno, ni siquiera el endógeno, se colocó una navajilla de vidrio (fig. 7) que contenía 0.3 ml. de una solución de perclorato de mercurio 0.25 M en ácido perclórico 0.25 M, la cual actúa como un eficiente absorbente de etileno (Osborne, 1973).

Todas las soluciones, tanto las amortiguadoras como las hormonales, utilizadas en este trabajo fueron esterilizadas pasándolas a través de filtros

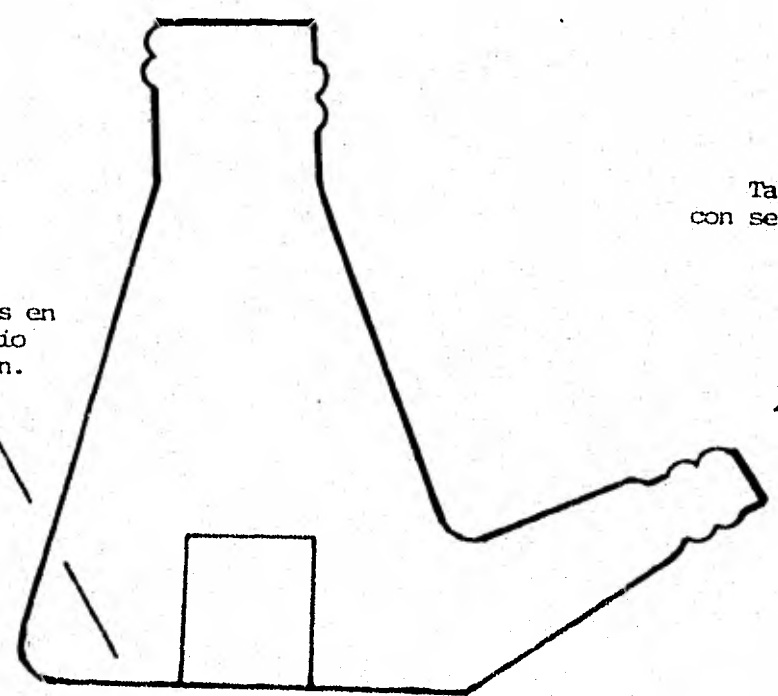
Tapón de rosca
con septum de teflón.



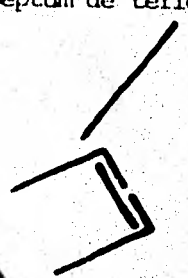
Navecilla de vidrio
con 0.3 ml de $Hg(ClO_4)_2$
0.25M en $HClO_4$ 0.25 M.



100 aleuronas en
10 ml de medio
de incubación.



Tapón de rosca
con septum de teflón.



Base para la navecilla.

Fig. 7 MATRAZ DE INCUBACION

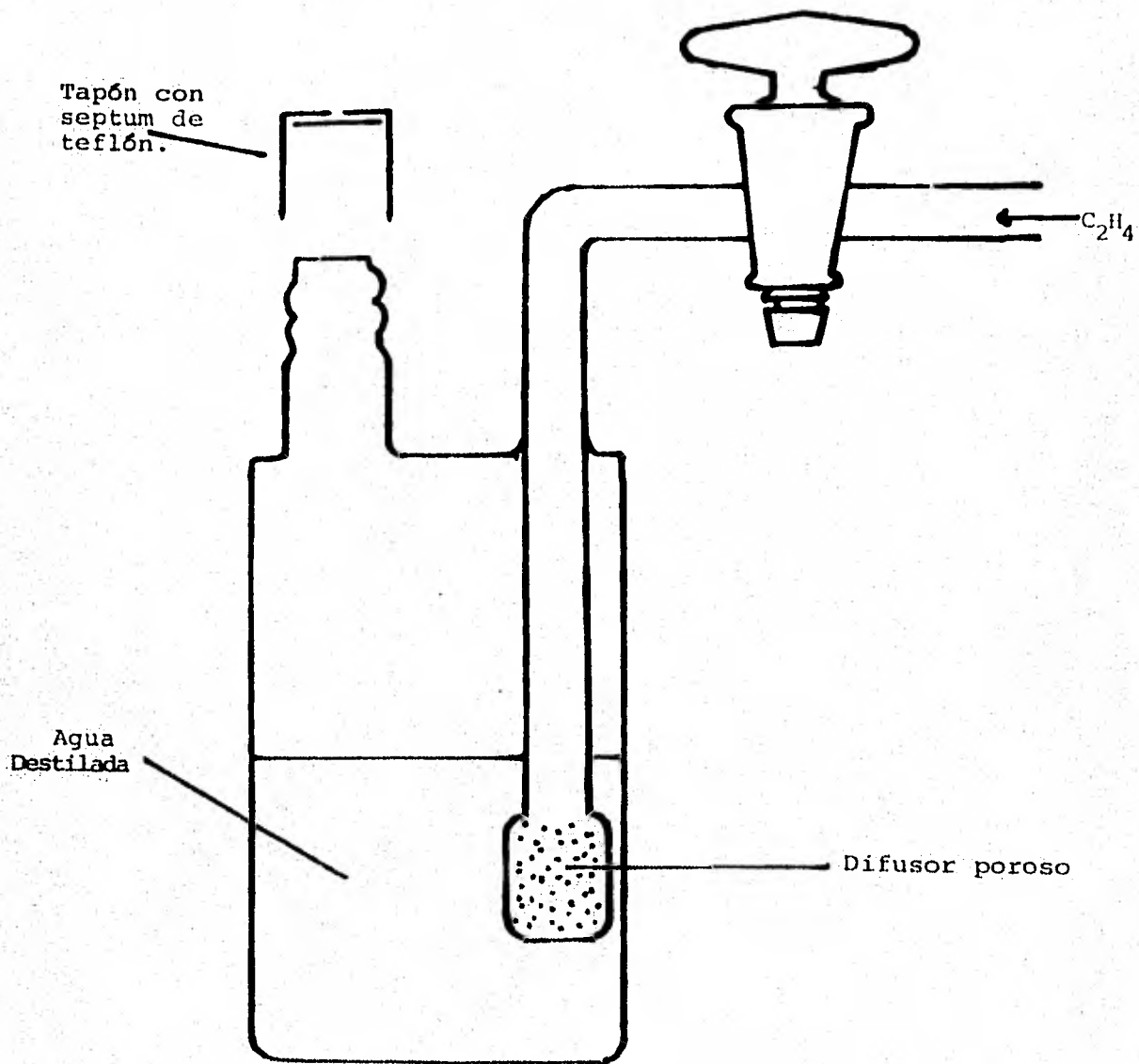


Fig. 8 SATURADOR DE ETILENO.

"Millipore" con poro de $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro. Las incubaciones se efectuaron en una incubadora "Callenkamp" a 28°C en la oscuridad y a 55 oscilaciones por minuto.

2.8 Radionaraje de los lípidos de la aleurona

Al terminar la incubación, las aleuronas fueron secadas de la forma antes descrita y colocadas en un matraz Erlenmeyer de 25 ml conteniendo 10 ml de medio de marcaje estéril e incubadas en las mismas condiciones durante exactamente 30 minutos. El medio de marcaje consistió en una solución amortiguadora de succinato de sodio 5 mM (pH 5.8) conteniendo cloruro de calcio 20 mM, L-serina 1 mM, L-metionina 1 mM y $0.5 \mu\text{Ci/ml}$ de cloruro de colina [$\text{Me} -^{14}\text{C}$]. Una manera preliminar de determinar la radioactividad incorporada por el tejido fue tomar una alícuota de 10 μl antes y después del período de incubación.

Al terminar este período, las aleuronas fueron lavadas con aproximadamente 200 ml. de agua destilada para eliminar el exceso de colina radioactiva e inmediatamente colocadas en n-butanol saturado con agua durante dos minutos en baño maría en ebullición, con el objeto de inactivar a las fosfolipasas presentes en el tejido. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió a la extracción inmediata o posterior, para lo cual se guardó a -70°C .

2.9 Extracción de los lípidos

El análisis de los lípidos de cualquier fuente conlleva a la separación de los componentes no lipídicos. Para ello, como primer paso, se homogeniza el tejido en un disolvente en el cual sólo sean solubles los lípidos. El material insoluble podrá removerse por decantación o por alguna forma de purificación; sería deseable que por este método se extrajeran todos los lípidos, pero en la práctica no es así. Por ello, un procedimiento de extracción adecuado debe de asegurar que tanto los lípidos polares como los neutros y los relativamente neutros sean lo suficientemente solubles en el

disolvente elegido, que los enlaces lipo-proteicos sean rotos y que las actividades de las lipasas sean mínimas. Este último punto es particularmente importante en plantas, las cuales contienen una gran variedad de fosfolipasas y fosfatasas que son activadas por disolventes orgánicos (Colborne, 1974; Quinn y Williams, 1978).

En el caso de los cereales, este paso es particularmente difícil ya que se ha demostrado que no hay ningún disolvente o sistema de disolventes capaz de extraer a todos los lípidos de los cereales (Acker et al, 1968; McMurray y Morrison, 1970). Pero al mismo tiempo se ha demostrado que el n-butanol saturado con agua es el mejor disolvente para extraer lípidos de cereales (Acker et al, 1968; McMurray y Morrison, 1970; Colborne, 1974). Por todo ello el n-butanol fue elegido como el disolvente de extracción para los lípidos en este trabajo.

El tejido se homogenizó en Ultraturrax a máxima velocidad durante seis minutos. Después de cada homogenización la suspensión se dejaba sedimentar y el sobrenadante se filtraba al vacío. El precipitado se volvía a resuspender con aproximadamente 30 ml del disolvente y se volvía a homogenizar. Este paso se repitió en total seis veces para asegurar una extracción completa y eficiente.

El extracto total fue evaporado a sequedad en un rotavapor a 50°C. Para prevenir la posible oclusión de los lípidos en el material sólido depositado sobre las paredes del matraz, el extracto seco fue disuelto en aproximadamente 10 ml de una mezcla de cloroforno-metanol (19:1 v/v) saturada con agua, añadiéndole unas gotas adicionales de agua destilada. La solución se evaporó a sequedad una vez más y se disolvió finalmente en 10 ml. de la misma mezcla. El extracto fue purificado inmediatamente o almacenado a -70°C.

2.10

Purificación del extracto lipídico

Todos los métodos de extracción de lípidos extraen simultáneamente, en ma-

por menor o menor grado, compuestos no lipídicos tales como agua, sales inorgánicas, carbohidratos, aminoácidos y nucleótidos. Todos ellos se encuentran como impurezas solubles en agua. Dado que la mayoría de los compuestos no lipídicos interfieren con los diversos métodos requeridos para separar y analizar a los lípidos, es necesario removerlos del extracto. Para esto existen varios métodos. Los más empleados se basan en la partición de los lípidos entre dos fases (Folch et al, 1957; Quinn y Williams, 1978): Una fase orgánica, que es en donde se disolverían los lípidos y la otra una fase puramente acuosa o una solución salina diluída. La adición de soluciones acuosas a sistemas de solventes orgánicos disminuye la polaridad de estos, sobre todo si el sistema contiene metanol. Por esta razón, el agua removerá una parte de los lípidos altamente polares, siendo este el principal inconveniente de este tipo de métodos.

Otros métodos se basan en la filtración a través de gelos de dextrán o celulosa (Siakotos y Rouser, 1965; Wuthier, 1966), pero la absorción de los lípidos a estos materiales y la elución de algunos glucolípidos con la fracción no lipídica produce pérdidas de lípidos.

Un método utilizado ampliamente ha sido el uso del Sephadex, tanto el hidrofílico (Wells y Dittmer, 1963; Rouser et al, 1967) como el especial para solventes orgánicos (Maxwell y Williams, 1967), aunque este último requiere que se retire toda el agua de los solventes antes de la purificación.

El uso del Sephadex hidrofílico no es igual en todos los casos. Una manera de usarlo es agregarlo seco en una cantidad aproximadamente igual en peso al agua presente para secuestrarla, removiéndose el disolvente en el cual se encuentran los lípidos por evaporación. Posteriormente el Sephadex es lavado con cloroformo, el cual removerá los lípidos y dejará al agua y a los compuestos no lipídicos en asociación con el Sephadex. Este método resulta en pérdidas al no poder remover del todo a los lípidos, además de que se requieren grandes cantidades de muestra.

Otra forma de utilizar el Sephadex hidrofílico es como soporte de una fase

estacionaria acuosa en un proceso de partición en columna. Se ha demostrado que este método, desarrollado por Rouser et al (1967), es muy eficaz en estudios cuantitativos, permitiendo además el uso de muestras pequeñas. Este método ya ha sido utilizado para fosfolípidos de aleurona de trigo, dando buenos resultados (Colborne, 1974; Varty y Laidman, 1976).

Antes de proceder a la purificación es necesario desgasar a todos los solventes mediante vacío.

El Sephadex (G-25) se hidrató en una mezcla de metanol-agua (1:1 v/v). Después de empacarlo en una columna de 1 cm de diámetro a una altura de aproximadamente 15 cm, se colocó una capa de arena lavada con ácido sobre el Sephadex. Posteriormente, la columna fue acondicionada lavándola secuencialmente con los siguientes sistemas de disolventes:

- a) Metanol-agua (1:1 v/v), 50 ml con un flujo de 2 ml/min;
- b) Cloroforno-metanol (19:1 v/v), saturado con agua, 20 ml con flujo de 1 ml/min;
- c) Metanol-agua (1:1 v/v), 30 ml con flujo de 2 ml/min;
- d) Cloroforno-metanol (19:1 v/v), saturado con agua, 15 ml con flujo de 1 ml/min.

El extracto crudo de lípidos fue disuelto en 2 ml de la mezcla cloroforno-metanol (19:1 v/v), saturada con agua y transferido cuantitativamente a la columna acondicionada, siendo lavada esta con 20 ml de la misma mezcla. El eluyente, conteniendo la muestra de lípidos purificados, fue colectado y evaporado a sequedad bajo un flujo de nitrógeno a 50°C. Los lípidos secos fueron disueltos en cloroforno-metanol (2:1 v/v) y llevados a 10 ml en un matraz volumétrico. La columna de Sephadex fue lavada y regenerada con 60 ml de metanol-agua (1:1 v/v).

2.11

Determinación de fósforo en lípidos

En este estudio se usó el método de Rouser et al (1966), ya que se ha demostrado que esta técnica es aproximadamente 14 veces más sensible que el clásico método de Fiske-SubbaRow (1925), aparte de ser mucho más rápida

(Dittmer y Wells, 1969).

Se transfirió una alícuota del extracto lipídico puro, la cual contenía aproximadamente 5 μg de fósforo inorgánico, a un matraz Kjeldahl de 50 ml y se evaporó a sequedad bajo un flujo de nitrógeno a 50°C. La muestra fue luego digerida con 0.7 ml de ácido perclórico 0.25 M a una temperatura de aproximadamente 100°C hasta que estuvo totalmente incolora, en aproximadamente 30 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron otros 0.7 ml de ácido perclórico 0.25 M más 6.6 ml de agua destilada, seguidos de 1 ml de molibdato de amonio al 2.5% después de lo cual se agitó perfectamente. Al final se agregó 1 ml de ácido ascórbico al 10%. Esta mezcla se transfirió a tubos de ensayo, se taparon con canicas y se calentaron en baño maría en ebullición durante 5 min. Una vez fríos a temperatura ambiente, se leyó su absorbancia a 800 nm. Se convirtió densidad óptica a μg de fósforo por medio de una curva de calibración preparada con fosfato de potasio monobásico como estándar, la cual tenía un rango de 1 hasta 10 μg de fósforo.

2.12

Determinación de incorporación de colina ^{14}C

Para determinar la incorporación de colina radioactiva en los fosfolípidos, se agregó una alícuota de 0.5 ml del extracto puro de lípidos totales a 10 ml de líquido de centelleo, el cual consistía en 5g de PPO/1 de tolueno. Las alícuotas del medio de incubación fueron medidas en 10 ml de líquido de centelleo Bray, el cual contenía 180g de naftaleno, 9g de PPO y .2g de dimetil POPOP por litro de dioxano (grado espectroscópico).

Todos los valores fueron corregidos a una eficiencia del 100% por referencia a una curva de calibración preparada con ^{14}C -hexadecano.

2.13

Separación de lípidos

Existen diversos métodos mediante los cuales pueden separarse los lípidos en sus clases constituyentes. Estos van desde un simple sistema de parti-

ción (dole, 1956) hasta cromatografía en papel (Wuther, 1976), en capa fina (Renkonen y Luukkonen, 1976) o en columna (Yakavenko y Mikhno, 1971; Rouser et al, 1976). De este último método, el mejor ha sido el que ha involucrado al ácido silícico (Hirsh y Ahrens, 1958; Wren, 1960; Sweeley, 1969) o algún tipo de intercambiador iónico (Allen et al, 1964). En este trabajo se utilizó el método de Rouser et al (1967), basado en el ácido silícico, para separar a los lípidos polares de los no polares.

El ácido silícico (Mallinckrodt, malla 100) fue procesado según el método de Hirsch y Ahrens (1958) para remover las partículas pequeñas. Una vez hecho esto, se desgasificó una suspensión de 1.3g de ácido silícico en 20 ml de cloroformo. Posteriormente se empacó en una columna esta suspensión y después de su asentamiento, se lavó con varios volúmenes de cloroformo. Una alícuota de la solución purificada de lípidos totales se evaporó a sequedad bajo nitrógeno a 50°C y se disolvió en cloroformo puro, aplicándose cuantitativamente a la columna de ácido silícico. La elución de los lípidos neutros, principalmente triglicéridos, se llevó a cabo con 30 ml de cloroformo.

Se logró hacer una separación de glucolípidos y fosfolípidos por elución secuencial con 25 ml de acetona y 35 ml de metanol respectivamente, pero las cantidades de ácidos grasos en cada separación fueron demasiado bajas para su análisis por cromatografía de gases, a pesar de que el detector utilizado, la ionización por flama de hidrógeno, es de los más sensibles. Por ello se decidió suprimir la acetona y eluir juntos a ambos grupos de lípidos polares con sólo 35 ml de metanol, quedando finalmente dos fracciones: lípidos neutros, principalmente triglicéridos y lípidos polares, glucolípidos y fosfolípidos.

2.14

Preparación de muestras para cromatografía de gases

El método adoptado, fue una modificación del método de Luddy et al (1968). Una alícuota de la muestra de lípidos, totales, neutros o polares, fue evaporada a sequedad en un tubo de ensayo con rosca bajo un flujo de nitrógeno y a 50°C, agregándoseles de 10-12 gotas de hidróxido de sodio 0.5 M en metanol. Antes de tapar se le pasó un breve flujo de nitrógeno al tubo. Se usaron tapones con septa de teflón para asegurar un sellado hermético y

una superficie no reactiva. La mezcla se agitó vigorosamente por 30 segundos y se dejó saponificar a 50°C durante 15 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 10 gotas de trifluoruro de boro al 10% en metanol, pasándole otro breve flujo de nitrógeno antes de cerrar el tubo, continuándose la reacción por otros 15 minutos a 50°C. Después de dejar enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 1.2 g de una mezcla de gel de sílice 60 H-cloruro de calcio (1:1 w/w), agitando la suspensión resultante vigorosamente por unos segundos. Los ésteres de ácidos grasos fueron aislados de esta mezcla con cuatro extracciones sucesivas de 2 ml de disulfuro de carbono cada una, con agitación durante 2 minutos, seguida de una centrifugación también por 2 min a 4,000 rpm. Los cuatro extractos combinados de disulfuro de carbono fueron almacenados a -70°C o evaporados a sequedad bajo un flujo de nitrógeno a 50°C. Los ésteres secos fueron disueltos en un volumen conocido de disulfuro de carbono y una alícuota apropiada de esta solución fue inyectada en la columna de cromatografía de gases.

2.15

Cromatografía de gases

Se preparó una columna de acero inoxidable de 2.8 m empacada con succinato de dietilenglicol (DEGS) al 20% en Chromosorb W 80/100, acondicionándose toda la noche a 190°C (Nestler y Zinkel, 1967; Pattison, 1978). Todas las separaciones de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se efectuaron en un sistema cromatográfico Sigma 1B Perkin Elmer (Perkin Elmer Corporation, Norwalk, Connecticut), equipado con un integrador electrónico. Todas las separaciones se efectuaron insotérmicamente a 180°C y con una temperatura del inyector de 200°C. El gas acarreador fue helio con un flujo de 30 ml/min. Los ésteres fueron detectados con un sistema de ionización por flama de hidrógeno.

RESULTADOS Y DISCUSION

Ha habido una gran controversia en lo que respecta a los reportes sobre los cambios cuantitativos en la composición de la membrana, particularmente el RE, de la aleurona de cereales y el papel que juega el AG_3 en este proceso (Jones y Jacobsen, 1978). Jones (1969a) basándose en estudios de microscopía electrónica reportó que el AG_3 causa una proliferación masiva del RER en aleurona de cebada y que esta proliferación se inicia durante la fase lag que precede a la síntesis de alfa-amilasa. Subsecuentemente, Evins y Varner (1971) reportaron que esta formación del RER dependiente del AG_3 se acompaña por síntesis de membrana, a juzgar por sus resultados de incorporación de colina-Me- ^{14}C en una fracción de RER parcialmente purificada. Koehler y Varner (1973) reportaron una incorporación similar de $^{32}PO_4$ inducida por AG_3 en la fracción de fosfolípidos de aleurona de cebada, aunque estos autores fueron incapaces de demostrar un efecto similar usando acetato- ^{14}C como precursor de lípidos.

Johnson y Kende (1971), reportaron que el AG_3 actuaba sobre la aleurona de cebada, estimulando las actividades de fosforil colina-citidil transferasa y de fosforil colina glicérido transferasa, dos enzimas de la ruta biosintética de la fosfatidil colina. El AAB, la actinomicina D y la cicloheximida, a concentraciones que inhibían la síntesis de alfa amilasa en aleurona de cebada (Chrispeels y Varner, 1967b), también fueron reportados como inhibidores tanto de la incorporación de colina-Me- ^{14}C en membranas (Evins y Varner, 1971) como del incremento en actividad, promovido por AG_3 , de las actividades de las dos enzimas mencionadas (Johnson y Kende, 1971). También se reportó que el manitol a concentraciones que suprimen la síntesis de alfa-amilasa estimulada por AG_3 , inhibía la incorporación, inducida por AG_3 , de $^{32}PO_4$ a los fosfolípidos pero que no tenía efecto sobre las actividades de ambas enzimas (Koehler et al, 1971).

Todas estas observaciones llevaron a Johnson y Kende (1971) a proponer una hipótesis para explicar el modo de acción del AG_3 en el control de

la formación de alfa amilasa en aleurona de cereales. En un intento por correlacionar la proliferación del RER y los cambios cualitativos en la síntesis de proteínas, con los cambios hormonalmente inducidos en el patrón de desarrollo en tejidos de mamíferos, Tata (1968) sugirió que diferentes grupos de polirribosomas en el citoplasma podían sintetizar distintos grupos de proteínas, alcanzándose una segregación topográfica por medio de una firme unión a las membranas. Dado que el AG_3 causa un cambio cualitativo en el patrón de síntesis de proteínas en células de aleurona de cebada sin ningún incremento notable en la tasa de síntesis de proteínas totales (Varner et al, 1965), Johnson y Kende propusieron la hipótesis de que la síntesis, inducida por AG_3 , de varias enzimas hidrolíticas en aleurona de cereales puede tener lugar sólo en polisomas unidos al RE recién sintetizado, mientras que las proteínas citoplásmicas pueden ser sintetizadas sobre polisomas libres. En este modelo sobre la acción del AG_3 , al igual que en modelos sobre el control traduccional en tejidos de mamíferos (Bankins et al, 1969), la hormona no activa necesariamente muchos genes para la síntesis final de un gran número de enzimas hidrolíticas. Pueden estar presentes y en constante recambio ARN mensajeros específicos para hidrolasas en la aleurona imbibida, pudiendo depender la síntesis de hidrolasas, inducida por AG_3 , de la disponibilidad de membranas apropiadas para la unión de polisomas que lleven a los mensajeros específicos de aquellas.

En contraste con estos reportes, Finn y Kende (1974) fueron incapaces de demostrar algún efecto del AG_3 sobre la incorporación de glicerol 3H a fosfolípidos de la aleurona de cebada aislada. Usando aleuronas de trigo y una metodología algo distinta, en la cual endospermos, en vez de aleuronas aisladas, fueron tratados con AG_3 , Laidman et al, (1974a, b) reportaron resultados contradictorios a los reportados para cebada. Ellos encontraron que el AG_3 no tenía efecto sobre la incorporación de colina- $Me-^{14}C$ en los fosfolípidos de la aleurona. Publicaciones posteriores (Varty, 1975; Varty y Laidman, 1976) describieron experimentos similares, en los cuales el AG_3 no mostraba ningún efecto sobre la incorporación de glicerol 3H ó $^{32}PO_4$. Además, la mayor actividad en la in-

corporación de todos los precursores ocurría durante la fase de imbibición de la germinación, cuando el RE se estaba formando rápidamente. Los análisis de los niveles de fosfolípidos totales por estos mismos autores estaban de acuerdo con los estudios con precursores radioactivos y demuestraban un incremento en los fosfolípidos totales de membrana durante la imbibición, sin ninguna estimulación posterior del contenido de fosfolípidos totales por el AG_3 . De hecho, las incubaciones a largo plazo con la hormona, más allá del período de inducción para la síntesis de hidrolasas, produjeron una disminución de los niveles de fosfolípidos en comparación a los niveles existentes en tejidos que no habían recibido tratamiento hormonal Varty y Laidman, (1976). Firm y Kende (1974) reportaron la misma situación en cebada. Estudios en microscopía electrónica confirmaron posteriormente que durante la imbibición estos cambios en el contenido de fosfolípidos eran debidos a una proliferación del RE (Colborne et al, 1976). Estos resultados han sido comprobados mediante análisis morfométricos de la composición de RE de aleuronas aisladas de trigo (Buckhout et al, 1981). Estas observaciones ultraestructurales también indicaron que el AG_3 no tenía un efecto directo sobre la síntesis de RE en aleurona de trigo.

Jones y Jacobsen (1978) han aseverado que el hecho de que no se observe en trigo la síntesis de RE inducida por AG_3 reportada para cebada, se debe a diferencias en la manipulación experimental del tejido. Los experimentos con cebada involucraron la incubación de los endospermos en agua estéril o una solución amortiguadora por tres días antes de efectuar el aislamiento y la subsecuente incubación en una solución amortiguadora o en AG_3 ; mientras que los estudios efectuados en trigo involucraron la incubación de semillas o endospermos directamente en agua o en AG_3 . Jones (1980) trabajando sobre la actividad de NADH-citocromo C reductasa, una enzima marcadora del RE, en aleurona de cebada, ha señalado un incremento de 2 a 3 veces en la síntesis del RE durante la imbibición, lo cual está de acuerdo en términos generales con los cambios que suceden durante la imbibición en el contenido de membrana reportados para aleurona de trigo (Laidman et al, 1974a, b; Varty, 1975; Varty y Laidman, 1976; Colborne

et al, 1976; Buckhout et al, 1981) la incubación subsecuente de las aleuronas aisladas con AG_3 produjo un incremento del 80% en los niveles de citocromo C reductasa después de 24 horas de incubación. La incubación del tejido con AG_3 después de este tiempo provocó una rápida disminución en la actividad de la enzima marcadora, llegando a las 36 horas por debajo del 70%, comparada con la actividad original al comenzar el período de incubación. Dado que este trabajo parece indicar que la síntesis de RE inducido por AG_3 puede ser de naturaleza transitoria, se ha sugerido que los tiempos de incubación de las aleuronas usados por Colborne et al (1976) en sus estudios ultraestructurales, 4 días de incubación en AG_3 , pudieron haber dado lugar a un examen, por parte de Colborne et al, de células caracterizadas por su baja actividad de citocromo C reductasa y de ahí con un bajo contenido de RE.

Hasta la fecha no se ha hecho ningún intento por correlacionar los resultados sobre la actividad de citocromo C reductasa con otros estudios bioquímicos en los que se emplearon tiempos de incubación mas extensivos (Laidman et al, 1974a, b; Firm y Kende, 1974; Varty y Laidman, 1976). En el presente trabajo hemos reexaminado el papel de las hormonas vegetales en el control de la síntesis de fosfolípidos de membrana en aleurona de trigo aislada. Los endospermos fueron incubados en agua durante dos días antes del aislamiento y la subsecuente incubación de las aleuronas en soluciones amortiguadoras u hormonales. Este diseño experimental es similar al utilizado en los estudios en cebada. Las incubaciones se efectuaron por 24 y 48 horas, correspondiendo a las condiciones descritas por Jones (1980) para células con alta y baja actividad de citocromo C reductasa inducida por AG_3 . Además, se examinaron los efectos de todas las hormonas que se sabe están involucradas en el control de la síntesis de alfa-amilasa en aleurona de cereales sobre la composición de las membranas de las aleuronas tanto individualmente como en combinación.

3.1 Niveles de fosfolípidos totales de la capa de aleurona de trigo

Los resultados de los análisis de fosfolípidos totales expresados como μg de fósforo, se presentan en la tabla 3.1. Por medio del análisis de varianza se demostró que no existen diferencias significativas entre los controles y los distintos tratamientos hormonales. Esto indica que ninguna de las hormonas vegetales utilizadas en este estudio, induce un cambio neto en el contenido del material de membrana de la capa de aleurona. Esta observación está de acuerdo con trabajos previos efectuados en trigo, ya que las disminuciones reportadas de los niveles de fosfolípidos causados por el AG_3 y el AAB no se observaron sino hasta después de incubaciones prolongadas con estas hormonas (Varty y Laidman, 1976; Laidman, 1980). El hecho de que no se detecten cambios en los niveles de fosfolípidos totales no significa necesariamente que no tengan lugar algunos cambios en los niveles de membranas específicas, inducidos hormonalmente. Los cambios netos en el contenido de RE, en particular, podrían haber estado enmascarados por cambios correspondientes en los niveles de los lípidos de almacenamiento (secc. 1.7). Sin embargo, sería muy difícil que esto interfiriera con los estudios sobre la incorporación de precursores radioactivos, dado que la síntesis de fosfolípidos ocurre principalmente en el RE y no estaría oculta en experimentos realizados en tejido sin fraccionar.

3.2 Incorporación de colina-ME- ^{14}C en fosfolípidos de la capa de aleurona de trigo. Los resultados de la incorporación de colina-Me- ^{14}C en fosfolípidos se muestran en la figura 3.1. Todos los cambios reportados fueron significativos al nivel del 95%.

La síntesis de fosfolípidos se inició inmediatamente con la imbibición, a juzgar por los resultados de la incorporación de colina-Me- ^{14}C en los fosfolípidos 2 horas después de exponer el tejido seco al agua. La tasa de síntesis de fosfolípidos se incrementó durante las primeras 24 horas de imbibición y disminuyó en tejido imbibido durante 48 horas. Estas observaciones están de acuerdo con estudios previos sobre la tasa de biosíntesis de fosfatidil colina en capa de aleurona de trigo (Varty y Laidman, 1976) y confirman la sugerencia de que la imbibición proporciona el estímulo ini-

Tabla 3.I FOSFORO TOTAL DE LIPIDOS

TRATAMIENTO		UG DE FOSFORO/100 ALEURONAS*	
		\bar{X}	S
Imbibición:	2 hrs.	119.1	14.9
	12 hrs.	129.5	2.7
	24 hrs.	103.3	4.5
	48 hrs.	116.2	7.3
Controles:	24 hrs.	101.9	4.8
	48 hrs.	102.6	12.4
AG ₃ :	24 hrs.	104.4	11.7
	48 hrs.	102.9	4.2
Etileno:	24 hrs.	93.2	3.1
	48 hrs.	116.3	4.4
AG ₃ /Etileno:	24 hrs.	120.0	3.3
	48 hrs.	119.6	3.2
AAB:	24 hrs.	91.1	1.3
	48 hrs.	110.8	9.8
AAB/AG ₃ :	24 hrs.	118.6	11.3
	48 hrs.	114.5	10.0
AAB/Etileno:	24 hrs.	123.3	7.9
	48 hrs.	105.9	1.3
AAB/Etil./AG ₃ :	24 hrs.	122.7	2.6
	48 hrs.	122.1	1.7

* Todos los resultados se obtuvieron de al menos tres determinaciones.

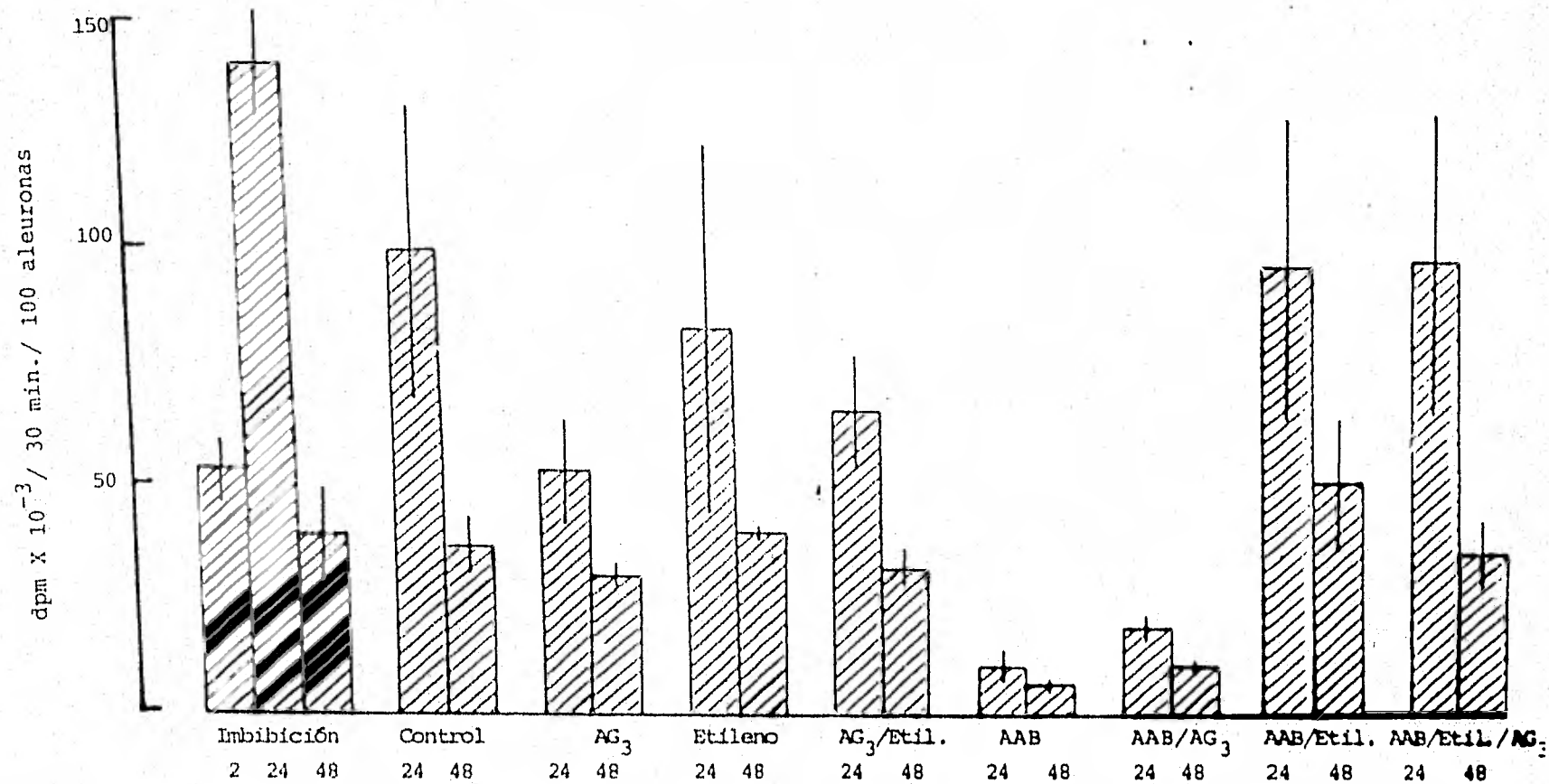


Fig. 3.1 Histograma que muestra la incorporación de colina-Me-¹⁴C en fosfolípidos de aleurona de trigo. En todos los casos, los números indican el número de horas que duró la incubación o, en donde se indica, la imbibición.

cial para la síntesis de membrana en este tejido. El que la tasa máxima de incorporación de colina-Me-¹⁴C ocurriera durante el primer día de imbibición está de acuerdo con el descubrimiento de que los máximos niveles de colina libre se encuentran en este tejido durante el mismo período de tiempo (R.G. Wyn Jones, comunicación personal).

En comparación con tejido obtenido de endospermos de dos días, la tasa de incorporación de colina-Me-¹⁴C se incrementó durante las primeras 24 horas de incubación de la aleurona aislada. Extendiendo el tiempo de incubación hasta 48 horas se produjo una disminución en la tasa de incorporación. Dado que estudios previos con endospermos demostraron que la tasa biosintética de fosfatidil colina declina progresivamente después de 24 horas de imbibición (Laidman et al, 1974a, b; Varty y Laidman, 1976) nuestros resultados parecerían indicar que la separación del endospermo almidonoso de la aleurona y la incubación subsecuente de la aleurona aislada en una solución amortiguadora, provoca algún cambio en la síntesis de membrana dentro del tejido. Jones (1980) reportó un incremento similar en la actividad de la citocromo C reductasa en la aleurona de cebada aislada.

No se observaron cambios significativos en las tasas de síntesis de fosfatidil colina en tejido incubado con AG₃ y etileno, tanto individualmente como en combinación, a pesar del hecho de que las aleuronas, durante el período experimental utilizado en este estudio, están sintetizando activamente alfa-amilasa y proteasa (López, 1981; Muggenburg, 1982). El AAB produjo una disminución significativa en la incorporación de colina-Me-¹⁴C a los fosfolípidos. Esta inhibición de la síntesis de fosfatidil colina inducida por AAB, fue independiente de la presencia del AG₃ y no fue anulada por esta última hormona. Este hecho es similar al efecto del AAB sobre la síntesis de alfa-amilasa inducida por AG₃ en este tejido. El etileno revertió completamente la inhibición inducida por AAB de la síntesis de fosfatidil colina. Este efecto del etileno no fue dependiente del AG₃ dado que la combinación del AG₃ y etileno no produjeron un incremento adicional en la incorporación de colina-Me-¹⁴C en comparación con tejido incubado solamente con etileno y AAB. Este efecto del etileno es una vez mas similar a la interacción previamente reportada de estas dos hormonas en el control de la formación de alfa-amilasa inducida por AG₃ en aleurona de cereales (Jacobsen, 1977; López, 1981; Gómez, 1982).

Nuestra incapacidad para detectar cambios inducidos por AG_3 en la biosíntesis de fosfatidil colina está de acuerdo con algunos reportes previos acerca del papel de esta hormona en el control de la formación del RE en aleurona de trigo y cebada (Firm y Kende, 1974; Laidman et al, 1974a, b; Varty y Laidman, 1976; Colborne et al, 1976; Buckhout et al, 1981) pero en contradicción con otros trabajos efectuados en aleurona de cebada aislada (Jones, 1969b; Evins y Varner, 1971; Koehler et al, 1972; Koehler y Varner, 1973; Johnson y Kende, 1971).

Dado que puede argumentarse que existe un alto grado de variabilidad en nuestros resultados las estimulaciones previamente reportadas para el AG_3 en la incorporación de colina- $Me-^{14}C$ de más de 10 veces (Evins y Varner, 1971) hubieran sido fácilmente detectables.

Mientras que los tiempos de incubación escogidos en el presente estudio muestran los efectos máximos del AG_3 sobre la formación del RE, (Jones, 1980), cualquier efecto transitorio de la hormona a corto plazo que ocurriera durante la fase lag de la síntesis de alfa-amilasa no habría sido detectado.

Aunque se ha reportado que el AAB inhibe la síntesis de fosfolípidos estimulada por AG_3 en aleurona de cebada (Evins y Varner, 1971; Johnson y Kende, 1971; Koehler y Varner, 1973) el presente trabajo hasta donde se sabe es el primero que indica que esta hormona puede estar también involucrada en la síntesis de membrana no inducida por AG_3 . Esta situación puede ser debida a varias causas: a que los tiempos de incubación utilizados en este estudio fueron más extensos, al hecho de que los trabajos previos sobre la acción del AAB han sido siempre llevados a cabo en la presencia de AG_3 y finalmente a que probablemente ésta es la primera vez que se ha intentado estudiar la acción del AAB sobre la síntesis de fosfolípidos en ausencia de etileno endógeno. Este último punto puede ser particularmente importante dado que se ha reportado que el etileno endógeno, tiene un efecto pronunciado sobre los niveles de alfa-amilasa inducida por AG_3 en aleurona de trigo (López, 1981) y como se ha demostrado aquí, el etileno es capaz de anular completamente este efecto del AAB.

Es interesante hacer notar que Gómez (1982) ha reportado que la inhibición

por AAB de la síntesis de alfa-amilasa inducida por AG_3 en aleurona de trigo, parece ocurrir en dos distintos niveles de control: transcripcional y post-transcripcional. Sólo el último sitio de la acción del AAB parece ser anulado por el etileno endógeno a las concentraciones hormonales empleadas en el presente trabajo. ¿Podría ser que este sitio post-transcripcional de la acción del etileno fuera el control de sitios de membrana de RER adecuados para la traducción del ARN mensajero de la alfa-amilasa? Es necesario efectuar mucho más trabajo antes de que esto pueda contestarse.

Debe hacerse notar que en tanto nos hemos referido a la incorporación de colina- $Me-^{14}C$ en fosfolípidos, como medida de la síntesis de membrana, no fueron observados cambios netos en el contenido total de fosfolípidos del tejido. Es posible que la incorporación de colina- $Me-^{14}C$ esté midiendo el recambio de membrana en la célula o posiblemente a un cambio en la organización de la membrana, por ejemplo, la conversión de lípidos de almacenamiento a estructuras de membrana metabólicamente activas. Se requirieron estudios más extensivos para dilucidar estas posibilidades.

3.3 Cambios en la composición de lípidos de la aleurona de trigo

La separación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por cromatografía de gases está ilustrada en la Fig. 3.2. El excelente poder de resolución de la columna es atestiguado por la separación casi completa de los ésteres del ácido oléico y del ácido esteárico. La identificación de los picos se efectuó por comparación de los tiempos de retención relativos, con ésteres metílicos estándares (tabla 3.II). Aunque se identificaron en los lípidos de la aleurona de trigo un total de 13 ácidos grasos, más del 99% de la composición de ácidos grasos totales estaba formado por los ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico y linolénico. Por lo tanto el análisis cuantitativo de la composición de los ácidos grasos, se confinó a estos 5 ácidos grasos mayoritarios.

Se encontró que la composición de ácidos grasos de la aleurona es completamente diferente de la del grano entero (tabla 3.III). El tejido

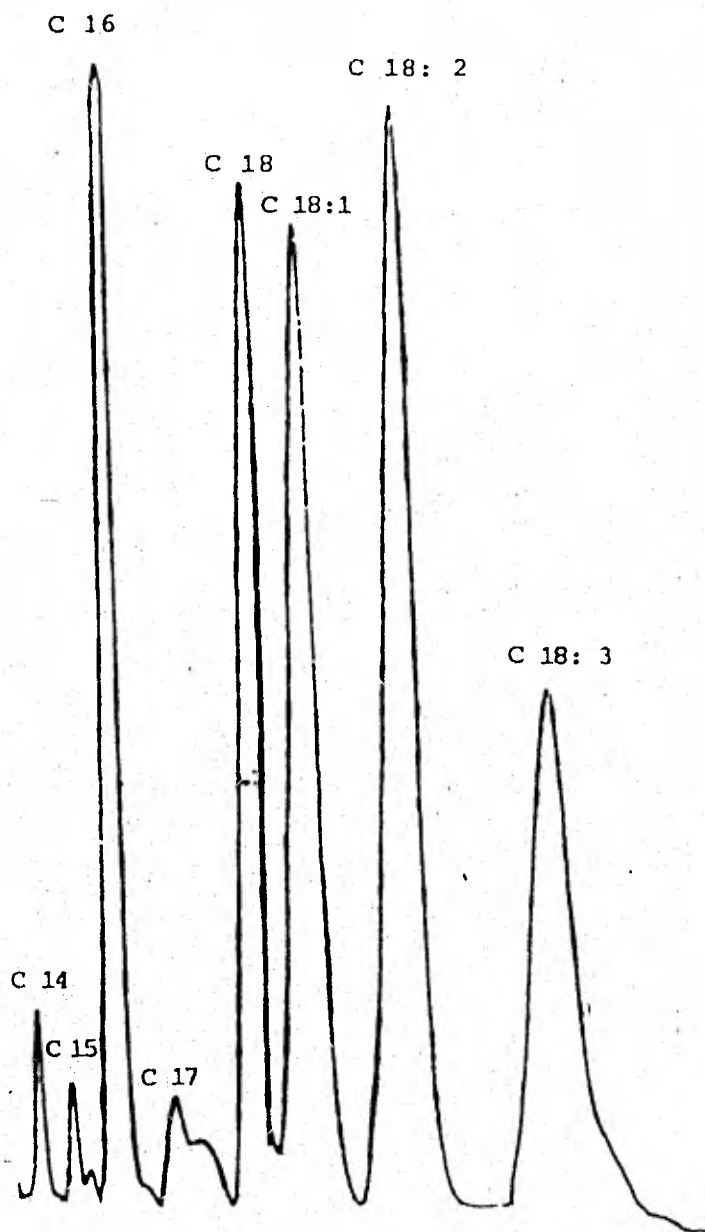


Fig. 3.2 Cromatograma que muestra la separación de los ésteres metálicos de los ácidos grasos. El poder de resolución de la columna se juzga por la separación de los ésteres de los ácidos esteárico y oléico.

Acido graso	TRR	FRR
Cáprico	0.134	NC
Caprílico	0.204	NC
Láurico	0.330	NC
Tridecanoico	0.437	NC
Mirístico	0.556	NC
Pentadecanoico	0.757	NC
Palmitico	1.000	1.000
Palmitoleico	1.180	NC
Palmitelaídico	1.180	NC
Margárico	1.480	NC
Esteárico	1.950	1.096
Oleico	2.180	1.171
Linoleico	2.890	1.030
Linolénico	3.850	1.083

Tabla 3.II Acidos grasos encontrados en la capa de aleurona de trigo (excepto palmitoleico y palmitelaídico).
 TRR= Tiempo de retención relativo al ac. palmítico.
 FRR= Factor de respuesta relativo al ac. palmítico.
 NC= No se calculó.

HORAS DE IMBIBICION	ACIDOS GRASOS (%)				
	C 16	C 18	C 18:1	C 18:2	C 18:3
GRANO QUIESCENTE	18.00	0.86	17.50	62.50	1.04
CAPA DE ALEURONA	15.03	2.47	21.23	55.69	5.19

Tabla 3.III Comparación de ácidos grasos de lípidos totales del grano entero y de la capa de aleurona aislada después de dos horas de imbibición.

de la aleurona fue un poco más rico en ácidos grasos insaturados, conteniendo cinco veces más ácidos linolénico que el grano entero.

Lípidos Totales

Las composiciones de las fracciones de lípidos totales de capas de aleurona aisladas después de varios tiempos de imbibición se presentan en la tabla 3.IV. No se observaron cambios significativos en las proporciones de ninguno de estos ácidos (Fig. 3.3.).

La composición de ácidos grasos de lípidos totales de capas de aleurona aisladas, incubadas bajo diferentes regímenes hormonales se presentan en las tablas 3.V y 3.VI. Esta composición fue casi igual a la de los lípidos neutros (c.f. tablas 3.IX y 3.XII). Similamente, los cambios en la composición de ácidos grasos de lípidos totales con tratamiento hormonal (Fig. 3.4 y 3.5) fueron casi idénticos a los observados en la fracción de lípidos neutros (Figs. 3.9 y 3.10) con una o dos excepciones menores, en donde los cambios en los lípidos polares fueron los suficientemente grandes para afectar los cambios generales, observados en los lípidos totales. Por lo tanto no se hará una discusión detallada de cambios en los ácidos grasos de los lípidos totales, ya que simplemente reflejarán cambios en la composición de los lípidos neutros.

Es interesante resaltar que en tanto los lípidos neutros y los totales fueron virtualmente indistinguibles uno de otro en su composición de ácidos grasos, la fracción de lípidos polares tuvo una composición enteramente diferente (c.f. tablas 3.VIII y 3. IX).

Lípidos Polares

En la aleurona aislada la composición de ácidos grasos de las fracciones de lípidos polares después de varios tiempos de imbibición se presenta en la tabla 3.VIII. Se percibieron cambios significativos en las proporciones de los cinco ácidos grasos mayoritarios (Fig. 3.3.). En particular las proporciones de los ácidos oléico y palmítico disminuyeron du-

HORAS DE IMBIBICION	ACIDOS GRASOS (%)				
	C 16	C 18	C 18:1	C 18:2	C 18:3
2	15.03 <u>+0.11</u>	2.47 <u>+0.03</u>	21.23 <u>+0.22</u>	55.69 <u>+0.08</u>	5.19 <u>+0.04</u>
24	14.98 <u>+0.22</u>	2.50 <u>+0.15</u>	21.33 <u>+0.13</u>	55.82 <u>+0.44</u>	5.49 <u>+0.61</u>
48	14.39 <u>+0.18</u>	2.56 <u>+0.03</u>	21.16 <u>+0.10</u>	57.71 <u>+0.03</u>	5.65 <u>+0.13</u>

Tabla 3.IV Cambios en la composición de ácidos grasos de lípidos totales de la capa de aleurona de trigo, después de dos días de imbibición. Los resultados son la media de cuando menos tres determinaciones.

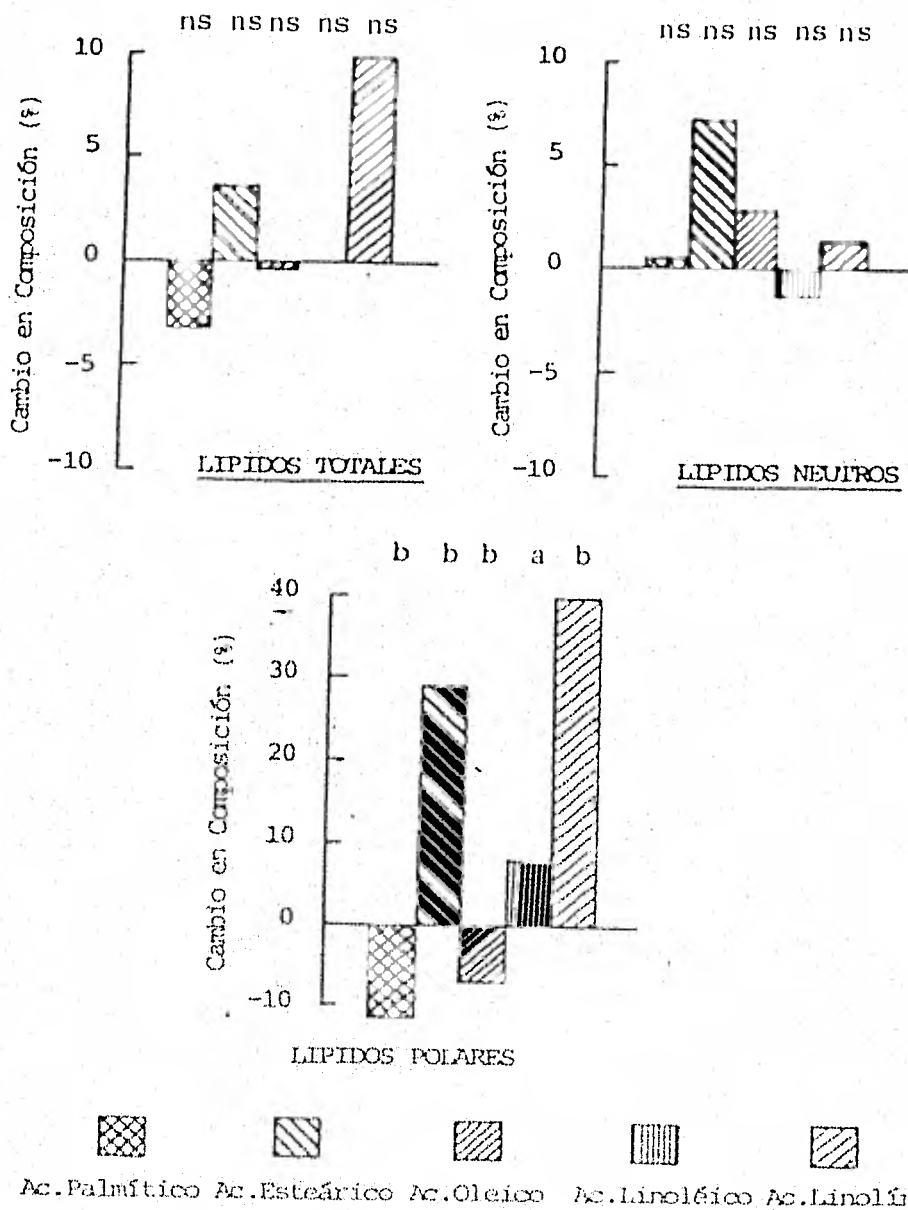


Fig. 3.3 Cambios en la composición de ácidos grasos de la aleurona, después de dos días de imbibición. Los resultados están expresados como el cambio porcentual en relación a tejido aislado de grano quiescente.
 a = diferencia significativa al 99%
 b = diferencia significativa al 95%
 NS= no significativo.

TRATAMIENTO	ACIDOS GRASOS (8)				
	C 16	C 18	C 18: 1	C 18: 2	C 18: 3
Control	14.58 ± 0.50	2.83 ± 0.23	21.06 ± 0.72	56.00 ± 0.51	5.24 ± 0.26
AG ₃	17.49 ± 0.17	2.86 ± 0.09	22.04 ± 0.18	52.67 ± 0.01	5.16 ± 0.16
Etileno	16.16 ± 0.46	2.76 ± 0.03	20.84 ± 0.14	54.75 ± 0.40	5.32 ± 0.34
AAB	14.57 ± 0.28	2.75 ± 0.04	20.83 ± 0.20	56.52 ± 0.20	5.04 ± 0.02
AAB/AG ₃	15.46 ± 0.21	2.82 ± 0.20	20.60 ± 0.48	56.02 ± 0.07	5.02 ± 0.36
AAB/Etileno	17.87 ± 0.82	1.96 ± 0.17	19.77 ± 0.53	55.64 ± 0.91	4.74 ± 0.17
AG ₃ /Etileno	17.72 ± 0.13	1.86 ± 0.31	21.36 ± 0.23	55.01 ± 0.29	4.88 ± 0.17
AG ₃ /AAB/Etileno	18.36 ± 0.46	2.10 ± 0.18	19.30 ± 0.20	55.38 ± 0.04	4.44 ± 0.33

Tabla 3.V Acidos grasos de lípidos totales de aleurona aislada, incubada durante 24 horas en una solución amortiguadora con o sin las hormonas indicadas. Los resultados son la media de al menos tres determinaciones.

TRATAMIENTO	ACIDOS GRASOS (8)				
	C 16	C 18	C 18: 1	C 18: 2	C 18: 3
Control	14.42 ± 0.30	2.87 ± 0.11	20.92 ± 0.14	56.44 ± 0.49	5.63 ± 0.18
AG ₃	15.65 ± 0.12	2.88 ± 0.05	22.15 ± 0.02	54.15 ± 0.23	5.32 ± 0.10
Etileno	16.14 ± 0.33	2.70 ± 0.08	21.25 ± 0.10	54.31 ± 0.42	5.12 ± 0.27
AAB	14.98 ± 0.39	2.74 ± 0.05	21.42 ± 0.18	56.06 ± 0.07	4.77 ± 0.25
AAB/AG ₃	16.13 ± 0.57	2.76 ± 0.12	20.46 ± 0.89	55.94 ± 0.10	4.57 ± 0.04
AAB/Etileno	17.54 ± 0.78	2.07 ± 0.25	20.40 ± 0.41	55.45 ± 0.81	4.11 ± 0.18
AG ₃ /Etileno	17.24 ± 0.22	2.40 ± 0.01	21.44 ± 0.48	55.56 ± 0.62	4.45 ± 0.25
AG ₃ /AAB/Etileno	17.16 ± 0.30	2.36 ± 0.12	20.26 ± 0.25	56.69 ± 0.21	3.89 ± 0.21

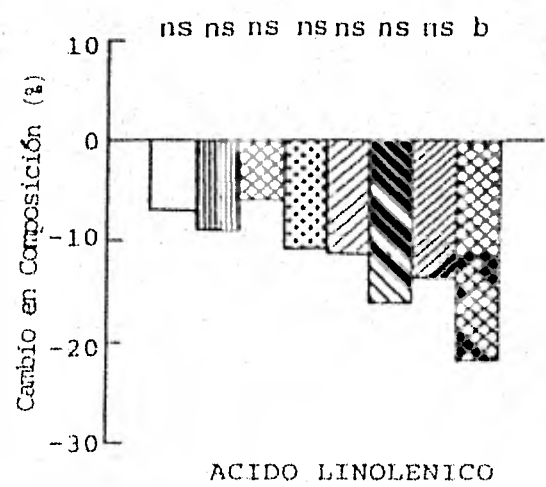
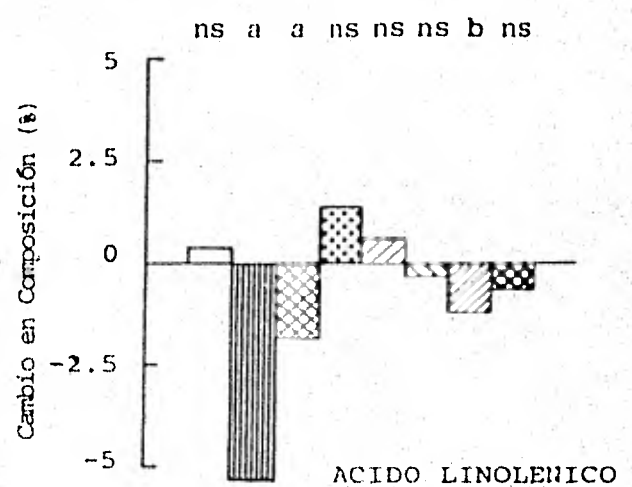
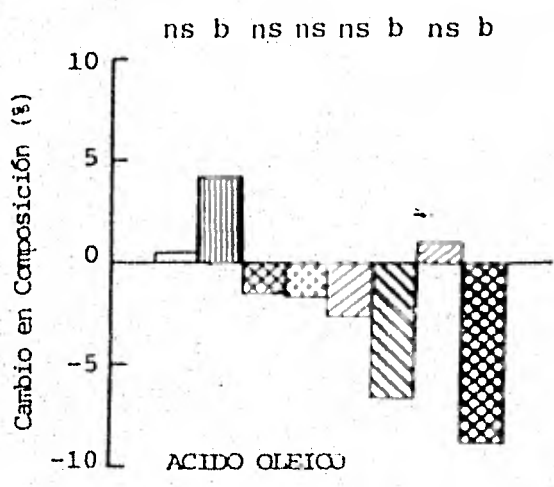
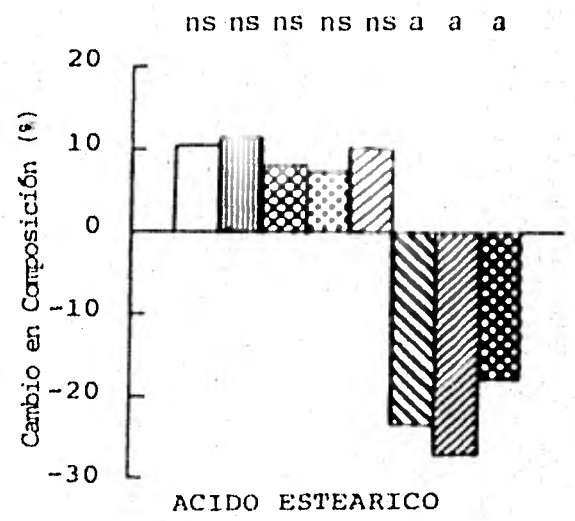
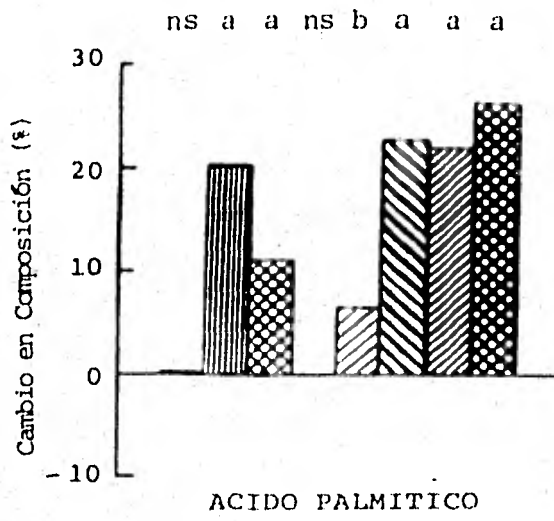
Tabla 3.VI Acidos grasos de lípidos totales de capas de aleurona incubadas 48 horas en una solución amortiguadora con o sin las hormonas indicadas. Los resultados son la media de al menos tres determinaciones.

Fig. 3.4 Cambios en los ácidos grasos de los lípidos totales de capa de aleurona aislada, incubada durante 24 horas en una solución amortiguadora con o sin AG_3 1×10^{-6} M, AAB 2×10^{-5} M y/o 135 ppm de etileno. Los resultados están expresados como el cambio porcentual en relación al nivel de ácidos grasos al comienzo del período de incubación. En el caso del tejido tratado con la hormona, la significancia fue examinada en comparación con un control correspondiente incubado en una solución amortiguadora durante el mismo período de tiempo.

a = significancia al 99%

b = significancia al 95%

NS= no significativo.



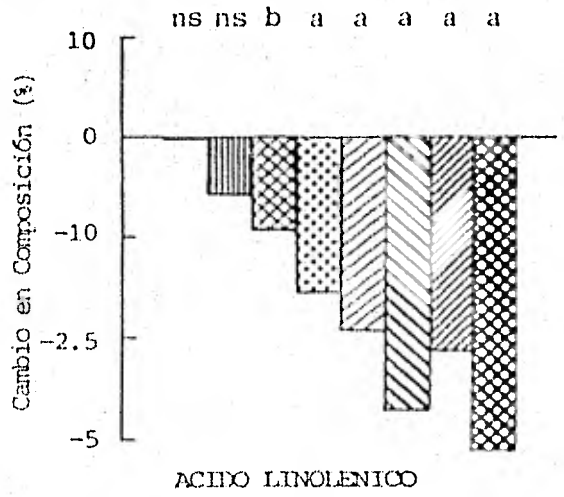
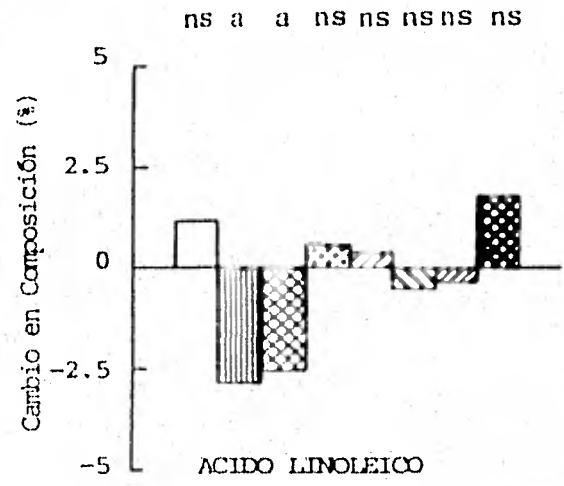
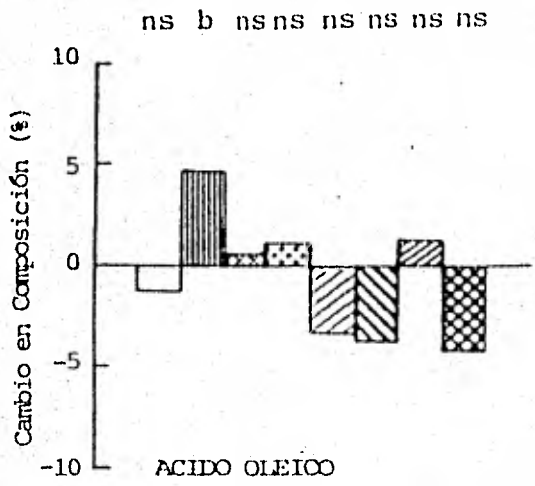
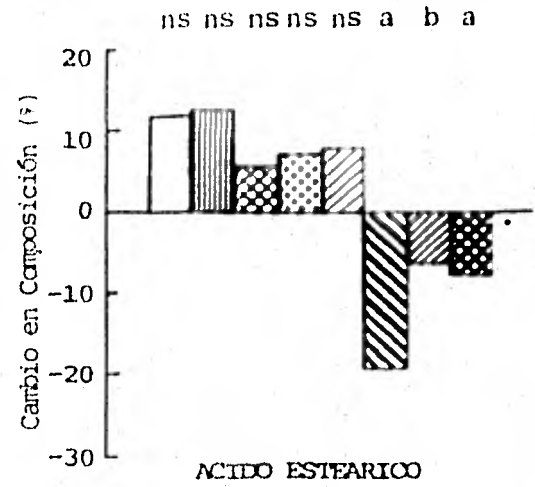
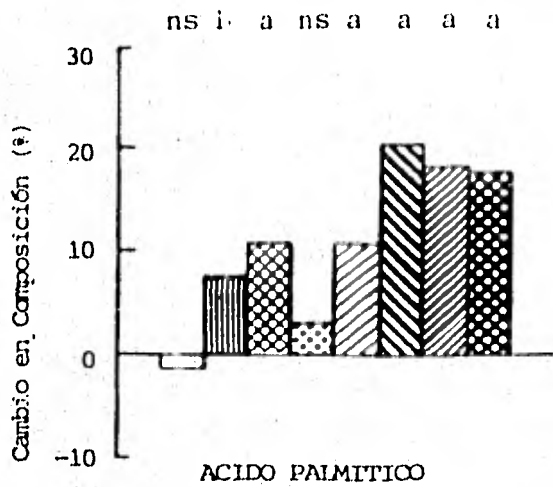
CONTROL AG₃ ETILENO AAB AAB/AG₃ AAB/Etileno AG₃/Etil. AAB/AG₃/Etil.

Fig. 3.5 Cambios en los ácidos grasos de lípidos totales de capa de aleurona aislada, incubada 48 horas con una solución amortiguadora con o sin AG_3 1×10^{-6} M, AAB 2×10^{-5} M y/o 135 ppm de etileno. Los resultados están expresados como el cambio porcentual en relación al nivel de ácidos grasos al comienzo del período de incubación. En el caso de tejido tratado con hormonas, la significancia se examinó en comparación con un control correspondiente incubado sin hormonas durante el mismo período de tiempo.

a = significancia al 99%

b = significancia al 95%

NS= no significativo.



CONTROL AG₃ Etileno AAB AAB/AG₃ AAB/Etil. AG₃/Etil. AAB/AG₃/Etil.

HORAS DE IMBIBICION	ACIDOS GRASOS (%)				
	C 16	C 18	C 18:1	C 18:2	C 18:3
2	19.89 <u>+0.26</u>	1.17 <u>+0.05</u>	21.91 <u>+0.04</u>	53.95 <u>+0.35</u>	2.43 <u>+0.12</u>
48	17.54 <u>+0.26</u>	1.51 <u>+0.01</u>	20.39 <u>+0.43</u>	58.20 <u>+0.94</u>	3.40 <u>+0.29</u>

Tabla 3.VII Cambios en la composición de ácidos grasos de los lípidos polares de la capa de aleurona, después de dos días de imbibición. Los resultados son la media de al menos tres determinaciones.

rante la imbibición, mientras que los niveles de los ácidos estearico, linoléico y linolénico se incrementaron. En términos generales, en la fracción de lípidos polares, el efecto de la imbibición fue incrementar la proporción de ácidos grasos polinsaturados en relación a los saturados. Estos cambios por la imbibición en los ácidos grasos de lípidos polares pueden reflejar alteraciones ultraestructurales en la composición de membrana, en particular, la proliferación del RE, reportados por otros investigadores (Colborne et al, 1976; Backhout et al, 1981).

La composición de ácidos grasos de lípidos polares de capas de aleurona aislada, incubadas bajo diferentes regímenes se presentan en las tablas 3.VIII y 3.IX. El etileno tuvo muy poco efecto sobre esta composición. El único cambio significativo observado con esta hormona, fue una disminución en el contenido de ácido estearico después de 48 horas de incubación. Las otras hormonas, sin embargo, produjeron cambios significativos en el contenido de ácidos grasos de los lípidos polares (Fig. 3.6 y 3.7).

El AG_3 , durante las primeras 24 horas de incubación disminuyó los niveles de ácido palmítico y ácido oléico incrementándose al mismo tiempo el contenido de ácido linoléico. Los niveles de ácido linolénico se incrementaron, pero este cambio se hizo estadísticamente significativo sólo hasta las 48 horas de incubación.

Aunque estas tendencias se mantuvieron en tejido incubado durante 48 horas en comparación a los controles, hubo un incremento real en el contenido de ácido palmítico y oléico durante la última mitad del período de incubación y una disminución correspondiente en los niveles de ácido linolénico. El resultado fue un incremento inicial en la proporción de ácidos grasos polinsaturados en los lípidos polares (Fig. 3.8); aunque esta relación disminuyó a las 48 horas, permaneció no obstante mas alta que la encontrada en los controles. Estos cambios inducidos por AG_3 probablemente reflejan cambios cualitativos en la composición de la membrana y/o propiedades de la capa de aleurona. La naturaleza aparentemente transitoria de la respuesta al AG_3 es similar a la reportada

TRATAMIENTO	ACIDOS GRASOS (%)				
	C 16	C 18	C 18: 1	C 18: 2	C 18: 3
Control	17.78 ± 0.11	1.41 ± 0.34	19.79 ± 0.36	59.53 ± 0.39	2.67 ± 0.08
AG ₃	15.98 ± 0.09	1.48 ± 0.14	15.23 ± 1.09	63.84 ± 0.12	3.30 ± 0.08
Etileno	18.22 ± 0.19	1.17 ± 0.04	19.70 ± 0.30	59.55 ± 0.38	3.01 ± 0.08
AAB	20.46 ± 0.59	1.43 ± 0.06	18.86 ± 0.43	56.44 ± 0.42	2.57 ± 0.10
AAB/AG ₃	20.84 ± 0.85	1.45 ± 0.24	17.76 ± 1.42	57.83 ± 0.12	3.04 ± 0.06
AAB/Etileno	21.88 ± 1.53	1.30 ± 0.34	17.48 ± 0.73	56.47 ± 0.20	2.53 ± 0.46
AG ₃ /AAB	16.39 ± 0.06	1.32 ± 0.51	14.49 ± 0.69	63.43 ± 0.68	3.50 ± 0.23
AG ₃ /AAB/Etileno	21.21 ± 0.43	1.63 ± 0.29	17.91 ± 0.67	54.82 ± 0.30	2.89 ± 0.55

Tabla 3.VIII Acidos grasos de lípidos polares de capas de aleurona aisladas, incubadas durante 24 hrs. en una solución amortiguadora con o sin las hormonas indicadas. Los resultados son la media de al menos tres determinaciones.

TRATAMIENTO	ACIDOS GRASOS (%)				
	C 16	C 18	C 18:1	C 18: 2	C 18: 3
Control	20.06 ± 0.41	1.80 ± 0.03	19.24 ± 0.68	57.00 ± 0.56	2.38 ± 0.03
AG ₃	17.91 ± 0.17	1.97 ± 0.05	17.34 ± 0.18	59.13 ± 0.35	3.38 ± 0.04
Etileno	19.78 ± 1.03	1.26 ± 0.23	18.47 ± 0.27	57.90 ± 0.35	2.66 ± 0.13
AAB	22.46 ± 0.31	1.29 ± 0.04	18.54 ± 0.68	55.16 ± 1.01	2.82 ± 0.33
AAB/AG ₃	22.05 ± 0.17	1.47 ± 0.14	18.47 ± 0.17	55.35 ± 0.47	2.73 ± 0.21
AAB/Etileno	22.14 ± 0.72	1.25 ± 0.11	18.49 ± 0.36	55.44 ± 0.18	2.74 ± 0.17
AG ₃ /Etileno	17.56 ± 0.18	2.46 ± 0.20	16.89 ± 0.73	59.79 ± 0.03	3.65 ± 0.34
AG ₃ /AAB/Etileno	22.33 ± 0.23	1.96 ± 0.04	18.73 ± 0.46	53.02 ± 0.14	3.26 ± 0.49

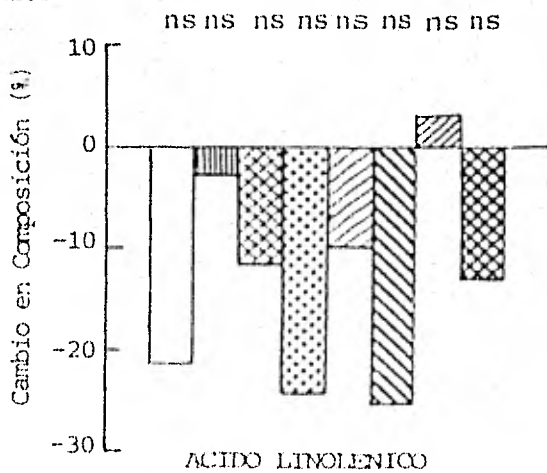
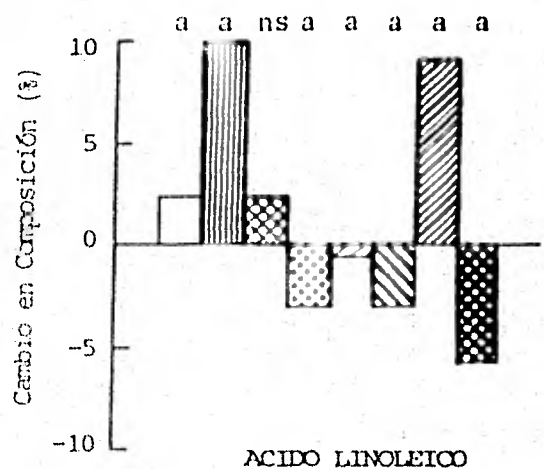
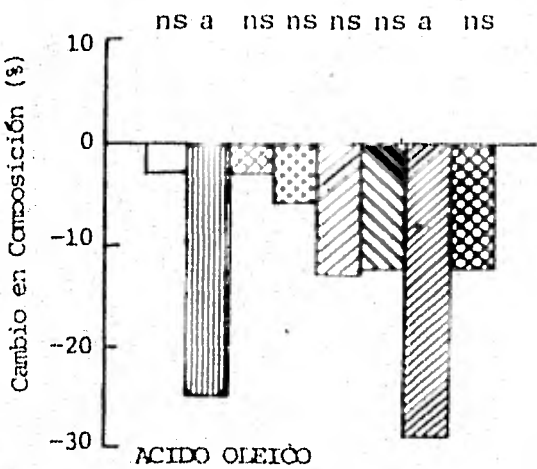
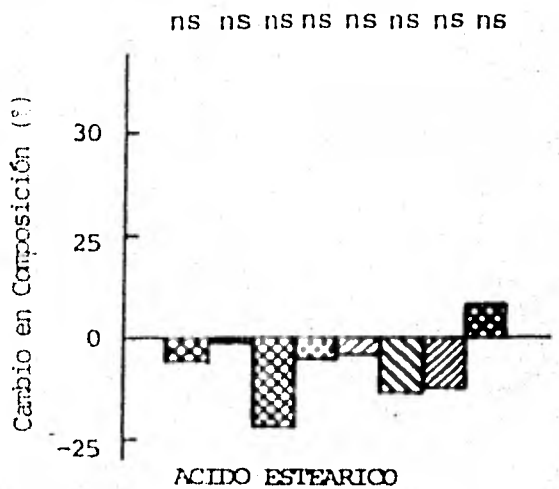
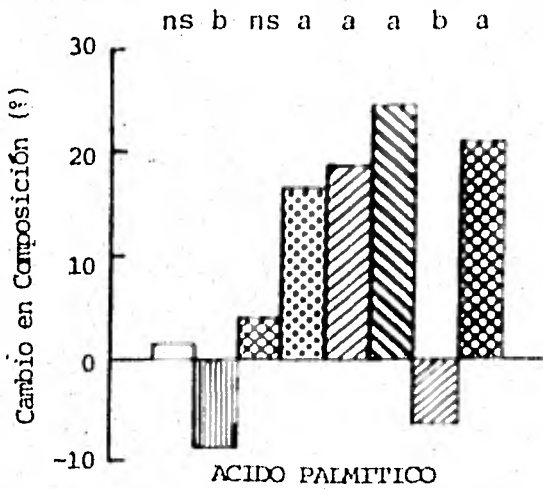
Tabla 3.IX Acidos grasos de lípidos polares de capas de aleurona aisladas, incubadas durante 48 hrs. en una solución amortiguadora con o sin las hormonas indicadas. Los resultados son la media de al menos tres determinaciones.

Fig. 3.6 Cambios en los ácidos grasos de lípidos polares de capas de aleurona aisladas, incubadas 24 horas en una solución amortiguadora con o sin AG_3 1×10^{-6} M, AAB 2×10^{-5} M y/o 135 ppm de etileno. Los resultados están expresados como el cambio porcentual en relación al nivel de ácidos grasos al comienzo de la incubación. En el caso del tejido tratado con hormonas, la significancia se estableció por comparación con un control incubado sin hormonas durante el mismo período de tiempo.

a = significancia al 99%

b = significancia al 95%

NS = no significativo.



Control. AG₃ Etileno AAB AAB/AG₃ AAB/Et11. AG₃/Et11. AAB AG₃/Et11

Fig. 3.7 Cambios en los ácidos grasos de lípidos polares de capas de aleu-
rona aisladas, incubadas durante 48 horas en una solución amorti-
guadora con o sin AG_3 1×10^{-6} M, AAB 2×10^{-5} M y/o 135 ppm de
etileno. Los resultados están expresados como el cambio porcentual
en relación al nivel de ácidos grasos al comienzo de la incubación.
En el caso de tejido tratado con hormonas, la significancia se es-
tableció por comparación con un control incubado sin hormonas du-
rante el mismo período de tiempo.

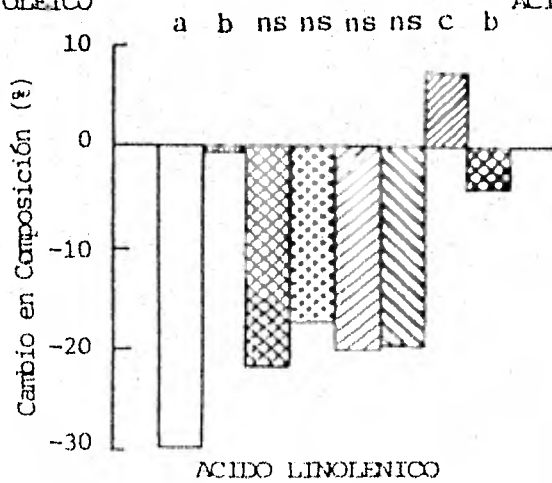
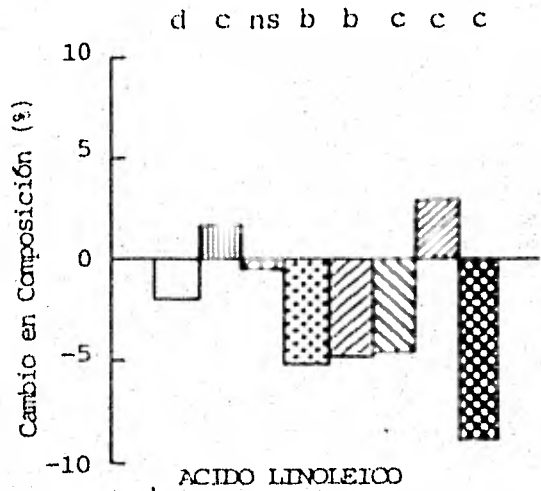
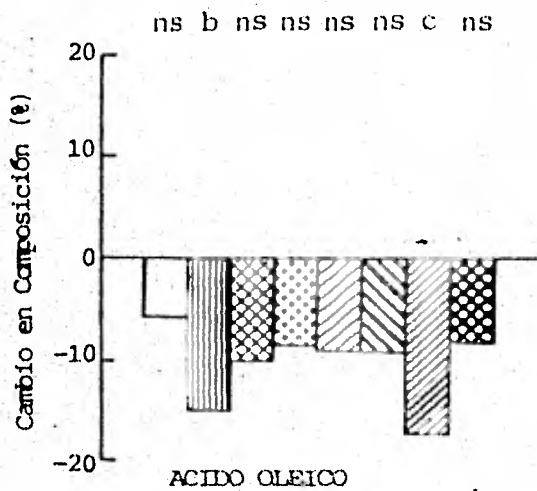
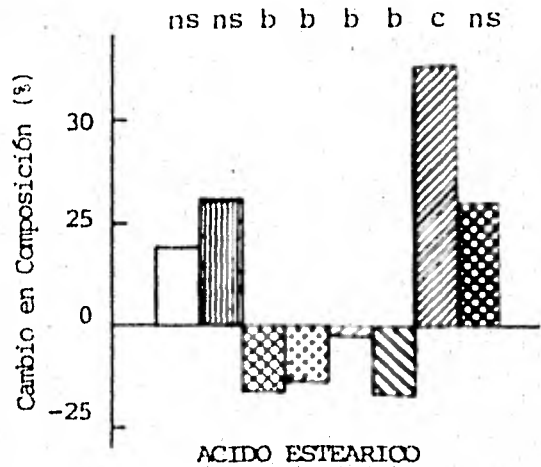
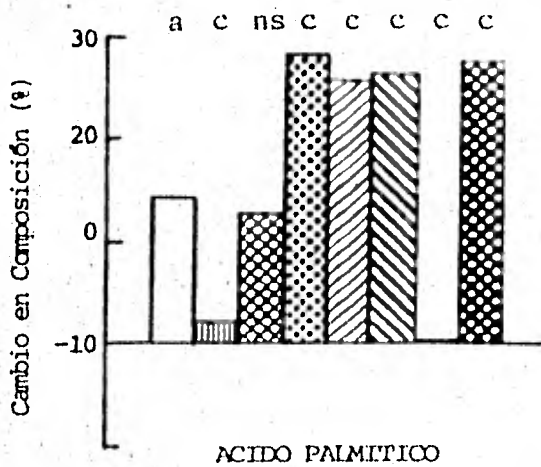
a = diferencia significativa al 95% en relación al comienzo de la
incubación.

b = significancia al 95%

c = significancia al 99%

d = significancia al 95%, en relación al control de 24 horas.

NS= no significativo.



Control AG₃ Etileno AAB AAB/AG₃ AAB/Etil. AG₃/Etil. AAB/AG₃/Etil.

por Jones (1980) para la actividad de la NADH-citocromo C reductasa. A las 24 horas del tratamiento con AG_3 la capa de aleurona de trigo sintetiza activamente amilasa (López, 1981) y proteasa (Muggenburg, 1982). La tasa de síntesis de estas dos hidrolasas alcanza un máximo después de 30 horas de tratamiento con AG_3 y declina de allí en adelante. En tejido de aleurona de cebada, esta disminución en la formación de hidrolasa después de 48 horas de tratamiento hormonal se caracteriza porque las células de la aleurona se hacen altamente vacuoladas, con una pérdida de un gran volumen de citoplasma y las largas cisternas características de RE apilado, sin embargo las células de tejido incubado en agua no muestran vacuolación progresiva; en vez de ello, conservan una morfología similar a la de células de endospermos imbibidas (Jones, 1980). Cambios similares en la morfología de células de aleurona de trigo explicarían los cambios en la composición de ácidos grasos observados entre 24 y 48 horas de incubación.

El AG_3 y el etileno combinados produjeron cambios similares en los niveles de ácidos grasos a los observados con AG_3 solo. La única diferencia cuantitativa observada fue un incremento significativo en los niveles de ácido esteárico después de 48 horas de incubación. Este incremento no había sido estadísticamente significativo en tejido incubado con AG_3 en la ausencia de etileno, sin embargo, a pesar de esta diferencia no podemos concluir que alguna acción sinérgica tiene lugar entre etileno y AG_3 en el control de la composición de ácidos grasos de lípidos polares, a diferencia del efecto sinérgico del etileno sobre la formación de alfa-amilasa inducida por AG_3 en este tejido (López et al, 1978; 1981).

En todos los casos en donde se empleó AAB, se observó un cambio completamente diferente en los ácidos grasos de lípidos polares. El AAB solo o en combinación con AG_3 y/o etileno, indujo un incremento en el contenido de ácido palmítico dentro de las primeras 24 horas de incubación y una disminución correspondiente en los niveles de ácido linoléico. Estos cambios se intensificaron hasta 48 horas, cuando también se observó una disminución significativa en el contenido de ácido esteárico. Esta res-

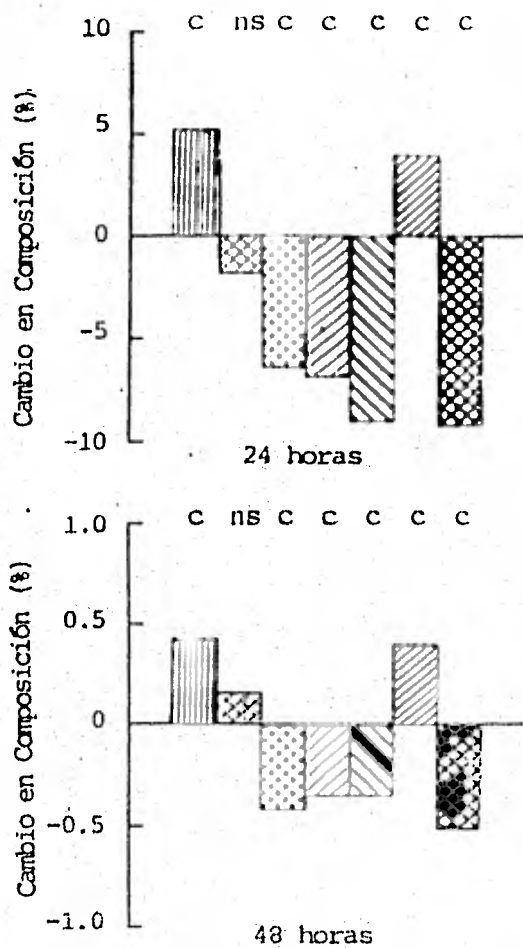


Fig. 3.8 Cambios en la proporción de ácidos grasos insaturados en relación a saturados en la fracción de lípidos polares de capas de aleuro-na. Los resultados están expresados en relación al tejido de control correspondiente, incubado sin hormonas durante el mismo período de tiempo.

a = significancia al 99%

b = significancia al 95%

c = significancia al 99%

NS= no significativo.

puesta al AAB fue opuesta a la observada con AG_3 . Ni el AG_3 ni el etileno, solos o en combinación, fueron capaces de revertir este efecto del AAB.

A las concentraciones hormonales empleados en este estudio, se observó una incapacidad similar del AG_3 y del etileno para revertir la inhibición por AAB de la síntesis de alfa-amilasa (López, 1981; Gómez 1982). Mientras el AG_3 tendió a incrementar la proporción de ácidos grasos polinsaturados en lípidos polares, el AAB tuvo el efecto opuesto (Fig. 3.8).

Es improbable que los cambios inducidos hormonalmente en la composición de los ácidos grasos de lípidos polares reportados aquí surjan de síntesis de novo de material de membrana, desde que no se observó un incremento en los niveles de fosfolípidos totales. Sin embargo, se ha sugerido que los fosfolípidos de membrana en tejido de aleurona de trigo se sintetizan por modificación de fosfolípidos pre-existentes almacenados en los esferosomas de las células (Jelsena et al, 1975; 1977). Nuestros datos estarían en completa concordancia con esta hipótesis.

Lípidos Neutros

La composición de ácidos grasos, de las fracciones de lípidos neutros de capas de aleurona aisladas después de diversos tiempos de imbibición se presentan en la tabla 3.X; no se observaron cambios significativos en las proporciones de los cinco ácidos grasos preponderantes (Fig. 3.3).

La composición de ácidos grasos de lípidos neutros en capas de aleurona aislada incubada bajo diferentes regímenes hormonales se presentan en las tablas 3.XI y 3.XII. A diferencia de la fracción de lípidos polares en donde el etileno tuvo muy poco efecto sobre su constitución de ácidos grasos, esta hormona gaseosa indujo, en la fracción de lípidos neutros, cambios significativos en las proporciones relativas de los ácidos palmítico y linoléico. Específicamente, el etileno provocó un incremento en la concentración del ácido palmítico concomitante, con una

HORAS DE IMBIBICION	ACIDOS GRASOS (%)				
	C 16	C 18	C 18: 1	C 18:2	C 18:3
2	14.51 <u>+0.07</u>	2.48 <u>+0.06</u>	20.79 <u>+0.21</u>	56.72 <u>+0.33</u>	5.06 <u>+0.45</u>
24	14.90 <u>+0.19</u>	2.72 <u>+0.29</u>	20.84 <u>+0.44</u>	55.30 <u>+0.92</u>	5.81 <u>+0.34</u>
48	14.56 <u>+0.40</u>	2.66 <u>+0.35</u>	21.37 <u>+0.51</u>	56.00 <u>+0.89</u>	5.13 <u>+0.34</u>

Tabla 3.X Cambios en la composición de ácidos grasos de lípidos neutros de la capa de aleurona, después de dos días de imbibición. Los resultados son la media de al menos tres determinaciones.

TRATAMIENTO	ACIDOS GRASOS (%)				
	C 16	C 18	C 18: 1	C 18: 2	C 18: 3
Control	14.90 ± 0.19	2.95 ± 0.04	21.08 ± 0.16	55.73 ± 0.76	5.44 ± 0.40
AG ₃	17.31 ± 0.82	3.00 ± 0.11	22.19 ± 0.45	53.07 ± 0.58	5.14 ± 0.33
Etileno	16.50 ± 0.36	2.90 ± 0.05	20.57 ± 0.31	54.17 ± 0.15	5.53 ± 0.22
AAB	14.50 ± 0.19	2.85 ± 0.03	21.09 ± 0.14	55.30 ± 0.37	5.59 ± 0.32
AAB/Etileno	18.12 ± 0.62	2.17 ± 0.13	19.47 ± 0.45	56.00 ± 0.90	5.25 ± 0.40
AG ₃ /Etileno	19.03 ± 0.29	2.19 ± 0.26	22.45 ± 0.35	52.32 ± 0.45	4.45 ± 0.48
AG ₃ /ABA/Etileno	17.53 ± 0.55	2.16 ± 0.08	19.42 ± 0.11	55.69 ± 0.08	4.41 ± 0.25
AAB/AG ₃	15.79 ± 0.11	3.07 ± 0.09	20.68 ± 0.41	54.94 ± 0.35	5.56 ± 0.46

Tabla 3.XI Acidos grasos de lípidos neutros de capas de aleurona aisladas, incubadas durante 24 horas con o sin las hormonas indicadas. Los resultados son las medias de al menos tres determinaciones.

TRATAMIENTO	ACIDOS GRASOS (%)				
	C 16	C 18	C 18: 1	C 18: 2	C 18: 3
Control	14.13 ± 0.01	2.70 ± 0.07	20.81 ± 0.24	56.08 ± 0.30	5.76 ± 0.04
AG ₃	15.29 ± 0.12	2.60 ± 0.15	22.06 ± 0.26	54.48 ± 0.45	5.53 ± 0.12
Etileno	15.91 ± 0.17	2.72 ± 0.03	21.63 ± 0.16	54.54 ± 0.05	5.53 ± 0.30
AAB	15.96 ± 0.25	2.71 ± 0.04	21.36 ± 0.38	55.39 ± 0.31	5.06 ± 0.11
AAB/AG ₃	16.22 ± 0.51	2.72 ± 0.17	20.68 ± 0.13	55.63 ± 0.16	4.84 ± 0.40
AAB/Etileno	17.65 ± 0.49	2.09 ± 0.25	20.38 ± 0.33	55.41 ± 1.12	4.16 ± 0.14
AG ₃ /Etileno	17.86 ± 0.48	2.17 ± 0.27	21.40 ± 0.55	54.62 ± 0.28	4.47 ± 0.47
AAB/AG ₃ /Etileno	16.90 ± 0.93	2.30 ± 0.06	20.28 ± 0.03	56.35 ± 0.32	4.17 ± 0.05

Tabla 3.XII Acidos grasos de lípidos neutrales de capas de aleurona aisladas, incubadas durante 48 horas en una solución amortiguadora con o sin las hormonas indicadas. Los resultados son la medida de al menos tres determinaciones.

disminución en los niveles de ácido linoléico. Este efecto se observó dentro de las primeras 24 horas de incubación y se mantuvo hasta 48 horas (Figs. 3.9 y 3.10).

Se observaron incrementos significativos en las proporciones de los ácidos oléico y palmítico por efecto del AG_3 , junto con una disminución de ácido linoléico; fue observable después de 24 horas de incubación y se mantuvo hasta 48 horas. No obstante, hubo una disminución en el contenido de ácido palmítico durante la última mitad del período de incubación y un aumento similar en la proporción de ácido linoléico.

El AG_3 y el etileno combinados, produjeron cambios más intensos en las proporciones relativas de los ácidos palmítico, oléico y linoléico, que cualquiera de ellas sola. Además, se observaron disminuciones significativas en el contenido de los ácidos estearico y linolénico dentro de las primeras 24 horas del tratamiento hormonal. Una vez más, los cambios fueron menos intensos después de 48 horas debido a una disminución en los niveles de los ácidos palmítico y oléico y un incremento en la proporción relativa del ácido linoléico. Sobre todo, parece haber una interacción sinérgica entre el AG_3 y el etileno en el control de la composición de ácidos grasos de los lípidos neutros.

Es interesante hacer notar que estos cambios inducidos por AG_3 solo y en combinación con el etileno son opuestos a los observados en los lípidos polares. Nuestros datos no son suficientes para decidir si existe una relación de causa y efecto entre estos dos fenómenos. Sin embargo, mencionaríamos que Mirbahar y Laidman (1981) han reportado una conversión inducida por AG_3 de fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina, en triglicéridos en la capa de aleurona de trigo.

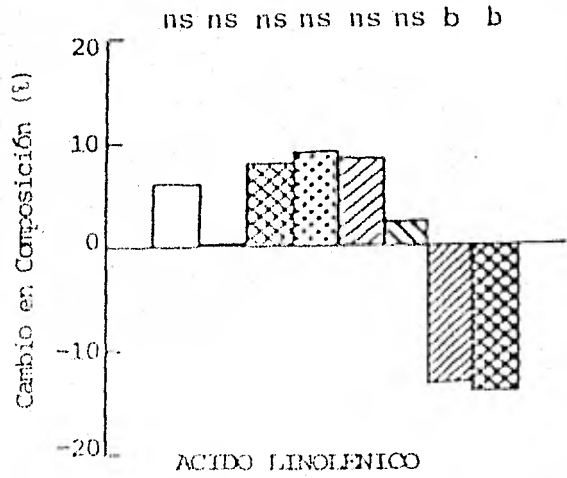
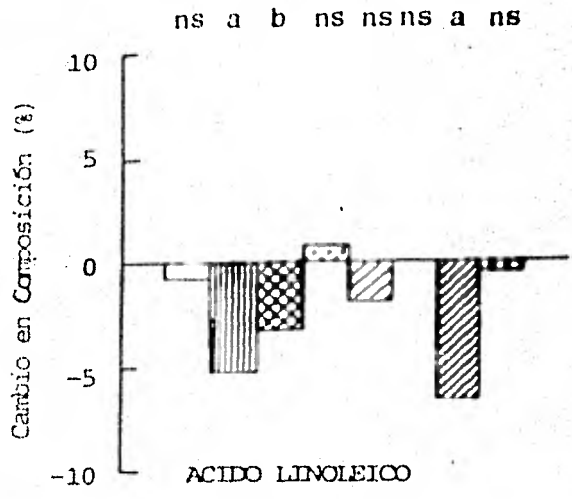
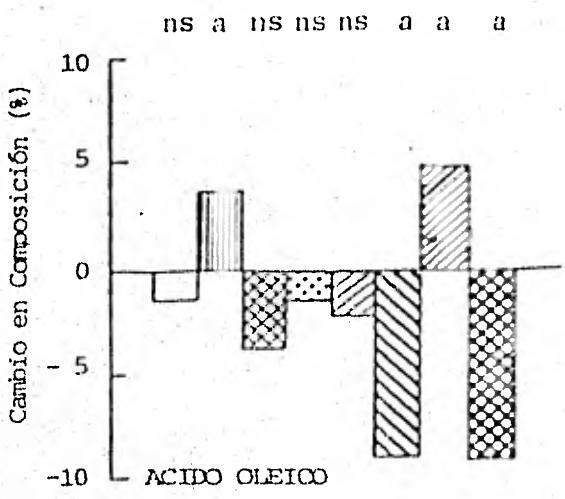
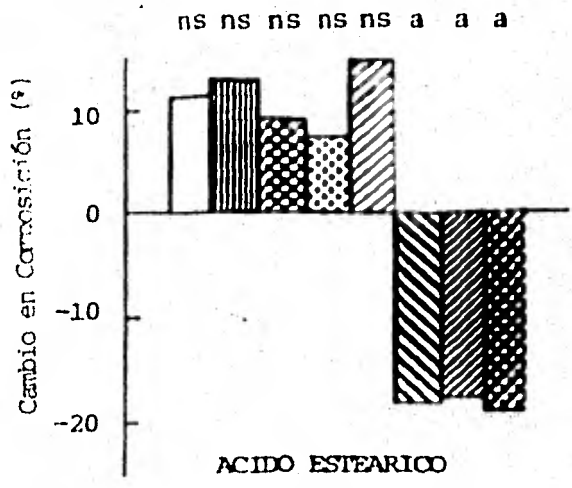
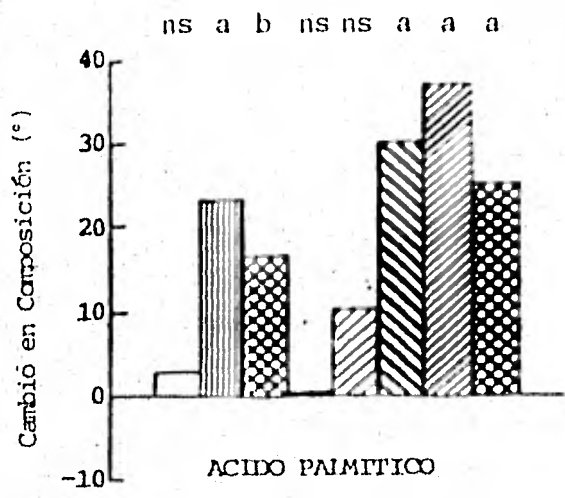
El AAB no indujo cambios significativos en los ácidos grasos de lípidos neutros dentro de las primeras 24 horas de incubación e inhibió completamente los cambios inducidos por AG_3 , durante el mismo período de tiempo (Fig. 3.9). Una pequeña disminución en el contenido del ácido linolénico se observó después de 48 horas de incubación con AAB (fig. 3.10)

Fig. 3.9 Cambios en los ácidos grasos de lípidos neutros de capas de aleurona aisladas, incubadas durante 24 horas en una solución amortiguadora con o sin AG_3 1×10^{-6} M, AAB 2×10^{-5} M y/o 135 ppm de etileno. Los resultados están expresados como el cambio porcentual en relación al nivel de ácidos grasos al comienzo del período de incubación. En el caso de tejido tratado con hormonas, la significancia se estableció por comparación con un control incubado sin hormonas durante el mismo período de tiempo.

a = significancia al 99%

b = significancia al 95%

NS= no significativo.



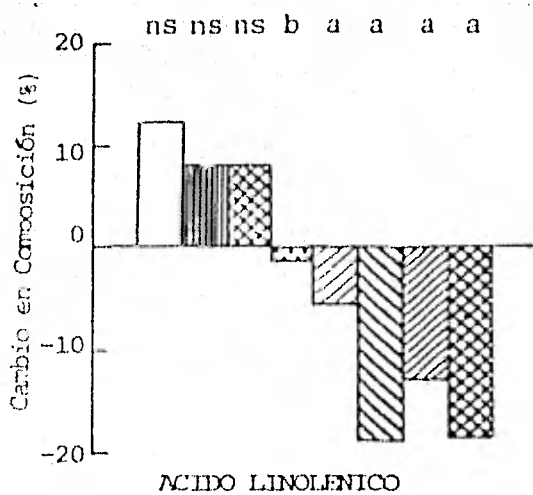
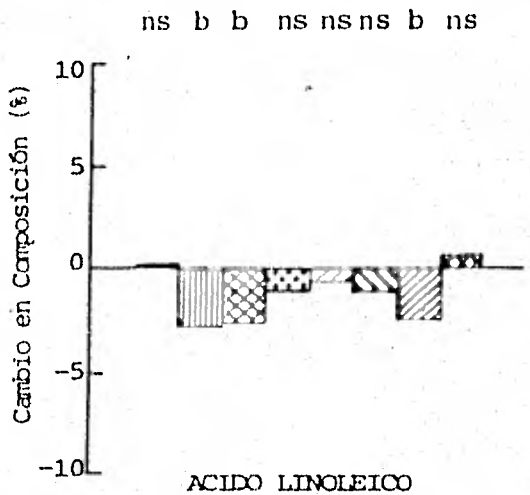
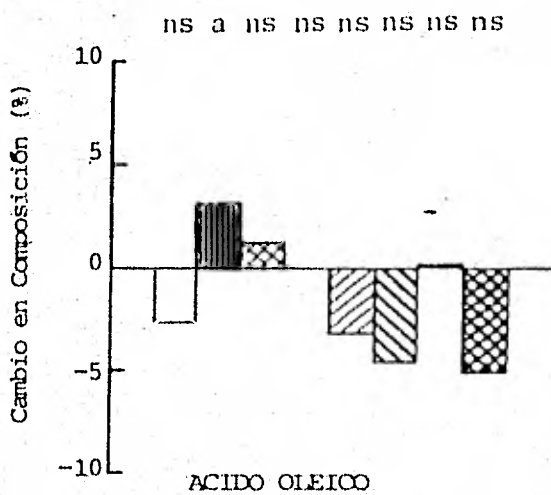
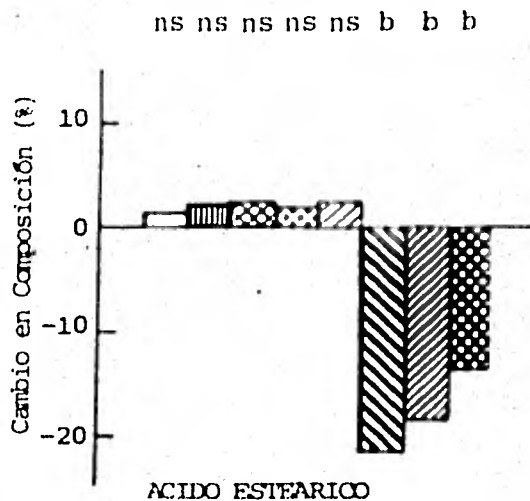
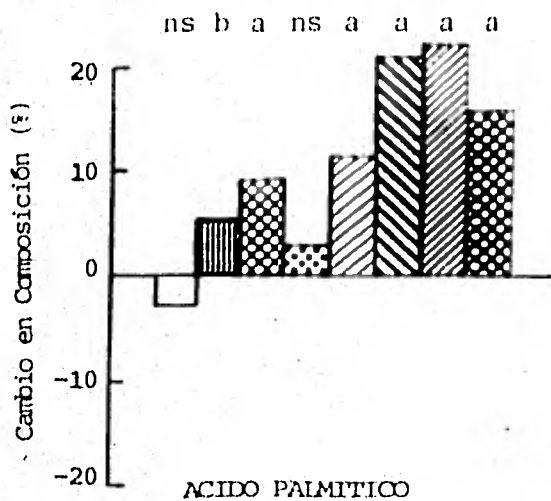
Control AG₃ Etileno AAB AAB/AG₃ AAB/Etil. AG₃/Etil. AAB/AG₃/Etil

Fig. 3.10 Cambios en los ácidos grasos de lípidos neutros de capas de aleu-
rona aisladas, incubadas durante 48 horas en una solución amorti-
guadora con o sin AG_3 1×10^{-6} M, AAB 2×10^{-5} M y/o 135 ppm de
etileno. Los resultados están expresados como el cambio porcentual
en relación al nivel de ácidos grasos al comienzo de la incubación.
En el caso de tejido tratado con hormonas, la significancia se es-
tableció por comparación con un control incubado sin hormonas du-
rante el mismo período de tiempo.

a = significancia al 99%

b = significancia al 95%

NS= no significativo.



Control AG₃ Etileno AAB AAB/AG₃ AAB/Etil. Etil/AG₃ AAB/AG₃/Etil.

Se observó una disminución similar en el nivel del ácido linoléico con AAB y AG₃ combinados, junto con un incremento en el contenido de ácido palmítico. Este último cambio fue probablemente un efecto del AG₃, dado que se ha observado que la inhibición por AAB de la formación de alfa-amilasa no es completa después de períodos de incubación tan extensos (Gómez, 1982).

Los cambios en los ácidos grasos de los lípidos neutros inducidos por una combinación de AAB y etileno, fueron diferentes a los observados cuando cada una de estas dos hormonas se empleó individualmente, indicando una interacción sinérgica de AAB y etileno en el control de la composición de ácidos grasos de lípidos neutros. Los niveles de ácido palmítico se incrementaron dentro de las primeras 24 horas y permanecieron así hasta 48 horas de incubación (Fig. 3.9 y 3.10). El contenido de los ácidos estérico y oléico, disminuyó dentro de las primeras 24 horas y a las 48 horas también fue observable una disminución significativa en la proporción relativa del ácido linoléico. No se observaron cambios en el contenido de ácido linoléico, a pesar de la presencia del etileno en el sistema, indicando que los cambios observados no fueron simplemente la suma de los efectos de cada hormona individualmente, sino que fueron verdaderamente debidos a una interacción hormonal dentro del tejido.

Al incubarse las capas de aleurona con las 3 hormonas se produjeron exactamente los mismos cambios en la composición de ácidos grasos a los encontrados con AAB y etileno. La disminución en el contenido de ácido linoléico observado con AG₃ y etileno no fue aparente, indicando que la inhibición por el AAB de los cambios inducidos por AG₃ en la composición de ácidos grasos de lípidos neutros no era reversible por una combinación de AG₃ y etileno, como en el caso de los lípidos polares, el AAB parece ser la hormona predominante bajo las condiciones experimentales empleadas en este estudio.

Los cambios en la composición de ácidos grasos de las diversas fracciones de lípidos descritos arriba, fueron generalmente un poco más peque

ños en comparación con reportes previos de cambios de ácidos grasos de membranas vegetales (Simon, 1974; Quinn y Williams, 1978; Jackson y St. John, 1980 Ashworth et al, 1981). Debe hacerse notar, sin embargo, que la capa de aleurona es particularmente rica en lípidos de almacenamiento, localizados dentro de los esferosomas de la célula (secc. - 1.4.1).

La presencia de tal cantidad de lípidos de reserva dentro del tejido, tendería a opacar cambios en la composición de ácidos grasos provocados por la formación de membrana y/o por la modificación en composición, causada por la influencia de las hormonas vegetales. Por lo tanto, todos los resultados obtenidos en este estudio fueron tratados por medio del análisis de varianza y la prueba de Student-Neumann-Kuels, para reducir la probabilidad de cometer errores de tipo II. De tal manera, muchos cambios que parecían significativos simplemente sobre la base de medias y desviaciones estándar alrededor de esas medias, fueron rechazados por falta de significancia estadística. Con base en ello, a pesar de pequeños cambios en la composición de ácidos grasos, observados en este estudio, podemos tener confianza de que tales cambios fueron reales y no se debieron a variación aleatoria en el sistema experimental.

Es interesante resaltar que los cambios inducidos hormonalmente en la fracción de lípidos polares, fueron mayores que los observados en los lípidos neutros. Los lípidos polares no sólo son más característicos de las membranas celulares (secc. 1.1.1.), sino que la cantidad en el material lipídico de reserva de la célula es mucho menor que la de los lípidos neutros.

Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten concluir que ninguna de las hormonas vegetales utilizadas en este estudio (AG_3 , AAB y etileno) indujo un cambio neto en el contenido del material de membrana de la aleurona de trigo. Este hecho está de acuerdo con trabajos previos realizados en trigo y algunos en cebada. Según los experimentos con precursores radioactivos, la síntesis de fosfolípidos de la membrana se inicia inmediatamente con la imbibición, incrementándose a las 24 horas y disminuyendo a las 48 horas, indicando que el único factor desencadenante de la síntesis de material membranar es la imbibición.

En relación con esto último, ni el AG_3 ni el etileno, solos o en combinación, indujeron cambios significativos en la incorporación de colina- $Me-^{14}C$. El AAB disminuyó significativamente esta incorporación, siendo este efecto completamente revertido por el etileno. Este efecto del etileno es similar a la interacción previamente reportada de estas dos hormonas en el control de la síntesis de alfa-amilasa en aleurona de cereales.

La imbibición también provocó cambios significativos en las proporciones de los cinco ácidos grasos preponderantes de los lípidos polares, a diferencia de los lípidos neutros, en donde no hubo diferencias significativas. La composición de los ácidos grasos de los lípidos polares, fue similar a la de los neutros, siendo ambas distintas a la de los polares. El AG_3 y el etileno indujeron cambios en los ácidos grasos de los lípidos neutros, siendo más intenso este efecto cuando ambos estaban presentes, lo que sugiere una interacción sinérgica. Una interacción similar se observó entre el AAB y el etileno. El AAB inhibió los cambios inducidos por AG_3 . Cuando las tres hormonas estaban presentes, los cambios fueron similares a los observados con AAB y etileno. El AAB tendió a ser la hormona preponderante.

En los lípidos polares, los cambios en los ácidos grasos por efecto de las hormonas fueron los más intensos. El etileno fue la única hormona que no tuvo efecto. El AG_3 aumentó la proporción de ácidos grasos insaturados. Cuando el etileno y el AG_3 se encontraban presentes, los efectos fueron similares a los observados con el AG_3 sólo. Por otra parte, el AAB tuvo exactamente el efecto opuesto al AG_3 , aumentando por ello la proporción de ácidos grasos saturados. En este caso no hubo reversión de los efectos del AAB ni por parte del AG_3 ni por parte del etileno.

BIBLIOGRAFIA

- Abdelkader, A., Mazliak, P. y Catesson, A.M. (1969) *Phytochemistry*, 8: 1121.
- Acker, L. y Schmitz, H.J. (1967) *Starke*, 19: 233.
- — y Schmitz, H.J. y Hamza, Y. (1968) *Gestrelde Mehl*. 18: 45.
- Acker, L. (1974) *Getr. Mehl. Brot*. 28: 181.
- Allen, C.F. *et al* (1966) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 43: 223.
- Appelman, D., Fulco, A.J. y Sugarman, P.M. (1966) *Pl. Physiol. Lancaster* 41: 136.
- Arron, G. y Bradbeer, J.W. (1975) *Proc. 3rd. Int. Cong. on Photosynthesis Research*. (M. Avron, ed.). Elsevier, Amsterdam p. 2081.
- Ashford, A.E. y Jacobsen, J.V. (1974) *Planta* 92: 73.
- Ashworth, E.N., Christiansen, M.N., St. John, J. y Patterson, G.W. (1981) *Pl. Physiol.* 67: 711.
- Benson, A.A. *et al* (1958) *J. Am. Chem. Soc.* 80: 4740.
- — y Maruo, B. (1958) *Biochem. Biophys. Acta* 27: 189.
- —, Daniel, H. y Wiser, R. (1959) *Proc. Nat. Ac. Sci.* 45: 1582.
- — y Strickland, E.H. (1960) *Bioch. Biophys. Acta* 44: 328.
- — (1963) *Adv. Lipid Res.* 1: 387.
- — (1966) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 43: 265.
- — (1971) En "Structure and function of chloroplasts" (M. Gibbs, ed.) Springer-Verlag. Berlin pp. 129-154.
- — y Jokela, H.T. (1976) En "Plant Biochemistry" (J. Bonner, y J.E. Varner, eds.) Ac. Press N.Y. p. 115.
- Ben-Tal, Y. y Varner, J.E. (1974) *pl. Physiol.* 54: 813.
- Billecoq, A. (1974) *Biochem. Biophys. Acta* 352: 245.
- Bishop, D.G. y Smillie, R.M. (1970) *Bioch. Biophys. Acta* 219: 179.
- Buckhout, T.J., Gripshover, B.M. y Morr e, D.J. (1981) *Pl. Physiol.* 68: 1319.
- Burg, S.P. y Burg, E.A. (1962) *Pl. Physiol.* 37: 179.
- Butler, K.W., Smith, I.C. y Schneider, H. (1970) *Biochem. Biophys. Acta* 219: 514.
- Bracker, C.E. y Grove, S.H. (1971) *Protoplasma* 73: 15.
- — y Heintz, C.E. (1971) *Cytobiol.* 4: 1.
- Briggs, D.E. (1963) *J. Inst. Brew.* 69: 13.
- — (1964) *J. Inst. Brew.* 70: 14
- Brockerhoff, H. (1967) *J. Lipid Res.* 8: 167.
- Brody, S.S., Brody, M. y Doring, G. (1970) *Z. Naturf* 25b: 367.
- Capaldi, R.A. (1974). *Sci. Am.* 230 (3): 26.
- Carter, H.E. *et al* (1961b) *J. Lipid Res.* 2: 223.

- Chang, S.B. y Lundin, K. (1965) *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 21: 424.
- — y Kulkarni, N.D. (1970) *Phytochemistry* 9: 927.
- Chapman, D. (1968) *Biomembranes, physical fact and function*. Ac. Press London.
- Chen, R. y Jones, R.L. (1974a) *Planta*, 119: 193.
- — (1974b) *Planta*, 119: 207.
- Ching, T.M. (1972) En "Seed Biology" t. II (T.T. Kozlowski, ed.). Ac. Press, London. P. 103.
- Chrispeels, M.J. y Varner, J.E. (1966) *Nature*, 212: 1066.
- — y Varner, J.E. (1967a) *Pl. Physiol.* 42: 398.
- — y Varner, J.E. (1967b) *Pl. Physiol.* 42: 1008.
- — (1976) *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 27: 19.
- Clarkson, D.T. (1977) En "The Molecular Biology of plant cells" (H. Smith, ed.) Oxford. P. 24.
- Colborne, A.J. (1974) *Tesis Ph. D. Universidad de Gales*.
- — y Laidman, D.F. (1975) *Phytochem.* 14: 2639.
- — Morris, G. y Laidman, D.L. (1976) *J. Exp. Bot.* 27: 759.
- Collander, R. (1959) En "Plant Physiology" t. II (P.C. Steward). Ac. Press. N.Y. p. 3.
- Collins, G.G., Jenner, C.F. y Paley, L.G. (1972) *Pl. Physiol.* 49: 404.
- Coombe, B.G. (1976) *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 27: 207.
- Cooper, M.J. y Beevers, H. (1969a) 244: 3507.
- — y Beevers, H. (1969b) 244: 3514.
- Coulon-Morelec, M.J. y Douce, R. (1968) *Bull. Soc. Chem. Biol.* 50: 1547.
- Davson, H. y Danielli, J.D. (1935) *J. Cell. Com. Physiol.* 5: 495.
- De Grier, J., Mandersloot, J.G. y Van Doenen, L.L.M. (1968) *Biochem. Biophys. Acta* 150: 666.
- DeHaas, G.H. y Van Doenen, L.L.M. (1964) *Bioch. Biophys. Acta* 84: 469.
- Dittmer, J.C. y Wells, M.A. (1969) En "Methods in Enzymology" t. XIV (J. M. Lowenstein, ed.) Ac. Press. N.Y. p. 482.
- Dittrich, P. y Raschke, K. (1977) *Planta* 134: 77.
- Doig, R.I., Colborne, A.J., Morris, G. y Laidman, D.F. (1975) *J. Exp. Bot.* 26: 387.
- Dole, V.P. (1956) *J. Clin. Invest.* 25: 150.
- Douce, R. et al (1968) *Bull. Soc. Fr. Physiol. Veg.* 14: 351.
- Duke, S.H., Schrader, L.E. y Miller, M.G. (1977) *Pl. Physiol.* 60: 716.
- Eastwood, D.E., Tavener, R.J.A. y Laidman, D.F. (1969) *Nature* 221: 1267.
- — y Laidman, D.L. (1971a) *Phytochem.* 10: 1275.
- — y Laidman, D.L. (1971b) *Phytochem.* 10: 1459.
- Eriksson, L.S. y Dallner, G. (1972) *J. Cell. Biol.* 55: 70.
- Erwin, J., Milanicka, D. y Bloch, K. (1964) *Comp. Bioch. Physiol.* 12: 19.

- Evins, W.H. y Varner, J.E. (1971) *Proc. Nat. Ac. Sci.* 68: 1631.
- — y Varner, J.E. (1972) *Pl. Physiol.* 49: 348.
- Falk, H. y Kleinig, H. (1968) *Arch. Mikrobiol.* 61: 347.
- Faure, M y Coulon-Morelec, M.J. (1957) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 39: 47.
- Ferguson, C.H.R. y Simon, E.W. (1973) *J. Exp. Bot.* 24: 307.
- Filner, P., Wray, P., Wray, J.L. y Varner, J.E. (1969) *Science* 165: 358.
- Firm, R.D. y Kende, H. (1974) *Pl. Physiol.* 54: 911.
- — (1975) *Planta* 125: 227.
- Fisher, N. (1962) En "Recent advances in food science" (J. Hawthorn y J.M. Leitch, eds.) t. I, Butterworths, London, p. 226.
- —, Broughton, M.E., Peel, D.J. y Bennet, R. (1964) *J. Sci. Food Agric.* 15: 325.
- Fiske, C.H. y SubbaRow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.* 66: 375.
- Fleischer, S., Fleischer, B y Stoekenius, W. (1967) *J. Cell Biol.* 32: 193.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane-Sloane-Stanley, G.H. (1957) *J. Biol. Chem.* 226: 497.
- Galliard, T. (1968) *Phytochem.* 7: 1907.
- Getz, G.S. et al (1968) *Biochem. Biophys. Acta* 152: 325.
- Gibson, R.A. y Paleg, L.G. (1972) *Biochem. J.* 128: 367.
- — y Paleg, L.G. (1975) *Aust. J. Pl. Physiol.* 2: 41.
- — y Paleg, L.G. (1976) *J. Cell. Sci.* 22: 413.
- Gómez, T.M. (1982) Tesis Licenciatura, Fac. de Química, UNAM (En preparación)
- Gortel, E. y Grendel, F. (1925) *J. Exp. Med.* 41: 439.
- Graveland, A. (1968) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45: 834.
- — (1969) *T.N.O. Nieuws*, 24: 472.
- Green, D.E. y Oda, T. (1961) *J. Biochem. (Tokyo)* 69: 742.
- — y Fleischer, S. (1963) *Bioch. Biophys. Acta*, 70: 554.
- — y Fleischer, S. (1964) En "Metabolism and physiological significance of lipids" (R.M.C. Dawson y D.N. Rhodes, eds.) Wiley and Sons, N.Y. p. 58
- Groove, S.N., Bracker, C.E. y Morré, D.J. (1968) *Science* 161: 171.
- Guidotti, G. (1972) *Ann. Rev. Biochem.* 41: 804.
- Gunstone, F.D. (1962) *Chem. Ind.* julio. 1214.
- Gurr, M.L. y James, A.T. (1975) "Lipid Biochemistry: An introduction" Chapman & Hall, Ltd. London.
- Hanke, D. (1977) En "The molecular biology of plant cells" (H. Smith, ed) Blackwell Scientific Publications, Oxford. p. 182.
- Hanson, A.D. y Kende, H. (1975) *Pl. Physiol.* 55: 663.
- Hay, J.G. (1942) *Cereal Chem.* 36: 119.
- Higgins, J.A. y Barnett, R.J. (1971) Abstracts 11th meeting Am. Soc. Cell. Biol. New Orleans. p. 125.
- —, Zwar, J.A. y Jacobsen, J.V. (1976) *Nature* 260: 166.

- Hirsch, J. y Ahrens, E.H. (1958) 233: 311.
- Hitchcock, C. y Nichols, B.W. (1971) "Lipid Biochemistry" Ac. Press. N.Y.
- Ho, D.T., Abhrams, J. y Varner, J.E. (1977) *Pl. Physiol.* 52: 44.
- Hochli, M. y Hackenbrook, C.R. (1976) *Proc. Nat. Ac. Sci.* 73: 1636.
- Hopfer, V., Lehninger, A.L. y Lennarz, W.J. (1970) *J. Memb. Biol.* 2: 41.
- Huang, A.C., Snipe, J.P., Chow, S.T. y Martin, R.B. (1974) *Proc. Nat. Ac. Sci.* 71: 359.
- Horton, R.F. y Osborne, D.J. (1967) *Nature* 214: 1086.
- Hutt, H.H. *et al* (1950) *Nature* 165: 314.
- Jacks, T., Tatsu, L.Y. y Altschul, A.M. (1967) *Pl. Physiol.* 42: 585.
- Jackson, P.C. y St. John, J.B. (1980) *Pl. Physiol* 66: 801.
- Jacobsen, J.V. y Varner, J.E. (1967). *Pl. Physiol.* 42: 1565.
- — Knox, R.B. y Pylotis, N.A. (1971) *Planta* 101: 189.
- — (1973) *Pl. Physiol.* 51: 198.
- — y Zwar, J.A. (1974) *Aust. J. Pl. Physiol.* 1: 343.
- — (1977) *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 28: 537.
- Jelsemá, C.L., Morré D.J. y Ruddat, M. 1975, *Proc Indiana Acad. Sci.* 84: 166.
- — Morré, D.J., Ruddat, M. y Turner, C. (1977) *Bot. Gaz.* 138: 138.
- Johnson, K.E. y Kende, H. (1971) *Proc. Nat. Ac. Sci.* 68: 2674.
- Jones, P.D., Holloway, P.W., Peluffo, R.O. y Wakil, S.V. (1969) *J. Biol. Chem.* 244: 744.
- Jones, R.L. (1969a) *Planta (Berl)* 87: 119.
- — (1969b) *Planta* 85: 359.
- — (1973) *Pl. Physiol.* 52: 303.
- — (1978) *Pl. Physiol.* 61. suppl., 609.
- — y Jacobsen, J.V. (1978) *Bot. Mag. Tokyo Spec. Issue* 1: 83.
- — (1980) *Planta* 150: 70.
- Kates, M. y Volcani, B.E. (1966) *Biochem. Biophys. Acta* 116: 264.
- Kauzmann, W. (1959) *Adv. Pr-t. Chem.* 14: 1.
- Keenan, T.W., Leonard, R.T. y Hodges, T.K. (1974) *Cytobiol.* 7: 103.
- Kende, H. y Gardner, G. (1976) *Ann Rev. Pl. Physiol.* 27: 267.
- — y Hanson, A.D. (1977) *Proc. 9th Int. Cong. Plant Growth Regulation* (P.E. Pilet, ed.) Springer-Verlag, Berlín. p. 172.
- Kent, N.L. (1975). *Technology of Cereals.* Pergamon Press. N.Y.
- Klotz, I.M. y Franzen, J.S. (1962) *J. Am. Chem. Soc.* 84: 3461.
- — y Farnham, S.B. (1968) *Biochemistry* 7: 3879.
- Koehler, D.E. y Varner, J.E. (1973) *Pl. Physiology* 52: 208.
- Komor, E. y Tanner, W. (1974) *J. Gen. Physiol.* 64: 568.

- Kuiper, P.J.C. (1970) *Pl. Physiol.* 45: 684.
- Laidman, D.L., Colborne, A.J., Doig, R.I. y Varty, K. (1974a) En "Mechanisms of regulation of plant growth" (R.L. Bielecki, A.R. Ferguson y M.M. Crisswell, eds.). *Proc. Royal Soc. New Zeal. Bull.* # 12, p. 581.
- — — Colborne, A.J., Doig, R.I. y Varty, K. (1974b) *Proc. 8th. Int. Conference on plant growth subst.* Tokyo, p. 626.
- — — (1980) *Monogr. Br. plant growth Regul. Group*, 5: 77.
- Lea, E.J.A. y Collins, J.C. (1979) *New Phytol.* 80: 4740.
- Lee, J.W. y Underwood, E.J. (1948) *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 26: 413.
- Lenaz, G., Haard, N.F., Silman, H.I. y Green, D.E. (1968) *Arch. Biochem Biophys*, 128: 293.
- Leskes, A., Siekevitz, P. y Palade, G.E. (1971a) *J. Cell. Biol.* 49: 264.
- — — Siekevitz, P. y Palade, G.E. (1971b) *J. Cell. Biol.* 49: 288.
- Ling, G.N. (1973) *Biophys. J.* 13: 807
- López, P.J., Arreguín, B. y Varty, K. (1978) *Pl. Physiol.* 61: suppl. 611.
- — — (1981) Tesis de Licenciatura, Fac. de Química, UNAM.
- Luddy, F.E., Barford, R.A., Herb, S.F. y Magidman, P. (1968) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45: 549
- Luzzati, V. y Husson, F. (1962) *J. Cell. Biol.* 12: 207.
- Lyons, J.M., Wheaton, T.A. y Pratt, H. K. (1964). *Pl. Physiol.* 39: 264.
- McKillican, M.E. (1964) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41: 354.
- — — y Sims, R.P.A. (1964) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41: 340.
- McLeod, A.M. y Millar, A.H. (1962) *J. Inst. Brew.* 68: 322.
- Mecham, D.K. (1971) En "Wheat: Chemistry and Technology" (Y. Pomeranz, ed) *Am. Asoc. Cereal-Chem.*, St. Paul Minn. USA, p. 393.
- Michelson, D.M., Horowitz, A.F. y Klein, M.P. (1973) *Biochem.* 12: 2637.
- Miller, K.R. (1979) *Sci. Am.* Julio.
- Morré, D.J. (1970) *Pl. Physiol.* 45: 791.
- — — Merrit, W.D. y Lembi, C.A. (1971a) *Protoplasma* 73: 43.
- — — Mollenhaver, H.H. y Bracker, C.E. (1971b) En "Results and problems in cell differentiation. II Origin and continuity of cell organelles" (J. Reinert y H. Ursprung, eds.) Springer-Verlag, Berlín, p. 82.
- — — y Mollenhaver, H.H. (1974) En "Dynamic aspects of plant ultrastructure" (A.W. Robards, ed) Mc. Graw Hill, London.
- — — (1975) *Annu. Rev. Pl. Physiol.* 26: 441.
- Morrison, W.R. (1979) *Annu. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* 16: 313.
- Muggenburg, I. (1982) Tesis Licenciatura, Fac. Química, UNAM.
- Nagley, P. y Hallinan, T. (1968) *Biochem. Biophys. Acta* 163: 218.
- Nelson, J.H., Glass, R.L. y Geldes, W.F. (1963). *Cereal Chem.* 40: 343.

- Nes, W.R. (1974) *Lipids* 9: 596.
- Nestler, F.M.M. y Zinkel, D.F. (1967) *Anal. Chem.* 39: 1118.
- Norris, F.A. y Mattil, K.F. (1947) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 24: 274.
- Ogawa, Y. e Imamura, S. (1965) *Proc. Jap. Acad.* 41: 842.
- Okita, T.W., DeCaleya, R. y Rappaport, L. (1979) *Pl. Physiol.* 63: 195.
- Osborne, D.J. (1973) "Biosynthesis and its control in plants" (B.V. Milborrow, ed.) *Ac. Press. N.Y.* p. 127.
- Overton, E. (1900) *Jahrb. Wiss. Bot.* 34: 669.
- Paleg, L.G. (1960) *Pl. Physiol.* 35: 293.
- —, Coombe, B.G. y Buttrose, N.S. (1962) *Pl. Physiol.* 37: 789.
- — y Hyde, B. (1964) *Pl. Physiol.* 39: 673.
- Pattison, J.B. (1978) "A programmed introduction to gas-liquid chromatography" Heyden & Son Ltd, London.
- Patton, S., Fuller, G., Loeblich, A.R. y Benson, A.A. (1966) *Biochem. Biophys. Acta* 116: 5770.
- Peers, F.G. (1953) *Biochem. J.* 53: 102.
- Pitman, M.G., Lutt, G.P., Lauchli, A. y Ball, E. (1974) *J. Exp. Bot.* 25: 147.
- Pollard, C.J. (1969) *Pl. Physiol.* 44: 1227.
- Poon, R., Richards, J.M. y Clark, W.R. (1981) *Bioch. Biophys. Acta*, 649: 58.
- Porter, K. P. (1961) En "The Cell" (J. Brachet y A.E. Mirsky, eds.) *Ac. Press, N.Y.* p. 621.
- Quinn, P.J. y Williams, W.P. (1978). *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 34: 109.
- Radunz, A. (1972) *Z. Naturforsch.* 276: 822.
- Radley, M.E. (1967) *Planta* 75: 164.
- Raison, J.K. Lyons, J.M. y Thompson, W.W. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 142: 83.
- Rappaport, L. (1980) *Bot. Gaz.* 141: 125.
- Renkonen, O. y Luukkonen, A. (1967) En "Lipid Chromatog. Analysis" (G.V. Marinetti, ed) *M. Dekker, N.Y.* t I, p.1.
- Richardson, S.H., Hultin, H.O. y Green, D.E. (1963) *Proc. Nat. Ac. Sci.* 50: 921.
- Robertson, J.D. (1964) En "Cellular membranes in development" (M. Locke, ed) *Ac. Press, N.Y.* pp. 1-24.
- Roelofsen, B. et al (1971) *Biochem. Biophys. Acta* 241: 925.
- Rothstein, M. y Gotz, p. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 126: 131.
- Roughan, P.G. y Batt, R.D. (1969) *Phytochemistry* 8: 363.
- — (1970) *Biochem. J.* 117: 1.
- Rouser, G., Siakotos, A.H. y Fleischer, S. (1966) *Lipids* 1: 85.
- —, Kritchevsky, G. y Yamamoto, A. (1967) En "Lipid Chrom. Analysis" (G.V. Marinetti, ed) *M. Dekker, N.Y.* p. 99.
- Rowell, G. y Goad G. L. (1962) *Biochem J.* 84: 738.
- — (1964) *Biochem. J.* 90: 48.

- Sachs, R.M. (1965) *Annu. Rev. Pl. Physiol.* 16: 73.
- Schreiber, U., Colbow, K. y Daver, W. (1976) *Biochem. Biophys. Acta* 423: 249.
- Schull, C.A. (1916) *Bot. Gaz.* 62: 1.
- Schultz, R.D. y Asurmaa, S.K. (1970) *Recent. Prog. Surf. Sci.* 3: 291..
- Schwertner, H.A. y Biale, J.B. (1973) *J. Lipid Res.* 14: 235.
- Sharon, N. (1974) En "Plant carbohydrate chemistry" (J.B. Pridham, ed) Ac. Press. N.Y. pp. 235-252.
- Siakotos, A.N. y Rouser, G. (1965) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42: 913.
- Siekevitz, P. et al (1967) En "Organizational biosynthesis" (H. Vogel, J.O. Løngren, y V. Bryson, eds.) Ac. Press. N.Y. p. 331.
- Siminovitch, D., Rheanuw, B., Poweror, K. y Lepage, M. (1968) *Cryobiol.* 5: 202.
- — Singh, J. y De la Roche, I.A. (1975). *Cryobiol.* 12: 144.
- Simon, E.W. (1974) *New Phytol.* 73: 377.
- Singh, J., De la Roche, I. A y Siminovitch, D. (1975) *Nature.* 257: 669.
- Singer, S.J. (1962) *Adv. Protein Chem.* 17: 1.
- — (1971) En "Structure and function of biomembranes" (L. I. Rothfield, ed.) Ac. Press, N.Y. p. 145.
- — y Nicolson, G.L. (1972) *Science* 175: 720.
- — (1974) *Ann. Rev. Biochemistry* 43: 805.
- Sjostrand, F.S. (1971) En "Cell membrane: Biological and pathological aspects" (G.W. Richter, ed) Williams and Wilkins, Baltimore Maryland p. 1.
- Slayman, C.L. y Slayman, C.W. (1974) *Proc. Nat. Ac. Sci.* 71: 1935.
- Srivastava, B.I.S. (1964) *Can. J. Bot.* 42: 1303.
- Suttle, J.C. y Kende, H. (1980) *Pl. Physiol.* 65: 1067.
- Tata, J.P. (1968) *Nature (London)* 219: 331.
- Taiz, L. y Jones, R.L. (1970) *Planta* 92: 73.
- Tanford, C. (1954) *J. Am. Chem. Soc.* 76: 945.
- Tavener, R.J.A. y Laidman, D.L. (1972a) *Phytochem.* 11: 981.
- — y Laidman, D.L. (1972b) *Phytochem.* 11: 989.
- Thompson, W.W. et al (1968) *Lipids* 3: 373.
- Tomkins G.M. et al (1969) *Science* 166: 1474.
- Tomos, A.D. y Laidman, D.L. (1979) *Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* 16: 119.
- Trewavas, A.J. (1976) En "Molecular aspects of gene expression in plants" (J.A. Bryant, ed) Ac. Press, London, p. 249.
- Van Deenen, L.L.M., DeGrier, J. (1964). En "The Red Cell" (C. Bishop y D. M. Burgeneror, eds.) Ac. Press. N.Y. p. 243.
- Van Kirk, C.A. y Raschke, K. (1978) *Pl. Physiol.* 61: 474.
- Varner, J.E., Chandra, R.G. y Chrispeels, M.J. (1965) *J. Cell and Comp. Physiol.* 66: suppl.: 55.

- Varty, K. (1975) Tesis Ph. D. Universidad de Gales.
- — y Laidman, D.L. (1976) *J. Exp. Bot.* 27: 748.
- Veerkamp, J.H., Mulder, I. y Van Deenen, L.L.M. *Biochem. Biophys. Acta* 57: 299.
- Vigil, E.L. y Rudat, M. (1973) *Pl. Physiol.* 51: 549.
- Wallach, D.F.M. y Zahler, P.H. (1966) *Proc. Nat. Ac. Sci.* 56: 1552.
- Whaley, W.G., Kephart, J.E. y Mollenhaver, H.H. (1964) En "Cellular membranes in development" (M. Locke, ed) Ac. Press, N.Y. p. 135.
- —, Dauwalder, M. y Kephart, J.E. (1970) En "Results and problems in cell differentiation. II Origin and continuity of cells organelles" (J. Reinert y R. Ursprung, eds) Springer-Verlag, Berlin. p. 1.
- Williams, R.D. y Chapman, D. (1970) *Prog. Chem. Fats*, 10: 3.
- Wilson, J.M. y Crawford, R.M.M. (1974a) *J. Exp. Bot.* 25: 121.
- — y Crawford, R.M.M. (1974b) *Nes Phytol.* 73: 805.
- Wintermans, J.F.G.M. (1960) *Biochem. Biophys. Acta* 44: 49.
- — (1963) *Colloq. Int. Centre Nat. Rech. Sci.* 119: 381.
- Wolff, I.A. (1966) *Science*, 154: 1140. .
- Wood, A. y Paleg. L.G. (1972) *Pl. Physiol.* 50: 103.
- — y Paleg. L.G. (1974) *Aust. J. Pl. Physiol.* 1: 31.
- Woodward, C.B. y Zwaal, R.F.A. (1972) *Biochem. Biophys. Acta* 274: 272.
- Wren, J.J. y Merryfield, D.S. (1970) *J. Sci. Food Agric*, 21: 254
- — y Szczerpanowska, A.D. (1965) *J. Sci. Food. Agric.* 16: 161.
- Wright, S.T.C. (1961) *Nature* 196: 699.
- Wuthier, R.E. (1966) *J. Lipid Res.* 7: 558.
- — (1976) En "Lipid Chrom. Anal". (G.V. Marinetti, ed) M. Dekker, N.Y. p. 59.
- Yakovenko, G.M. y Mikhno, A.I. (1971) *Fiziol. Biokhim. Kult. Raet.* 3: 651.
- Yano, H. (1960) *Hakko Kyokaisky* 18: 600 (Citado en *Chem. Abstracts* (1961) 55: 26145.
- Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B. y Collier, C.M. (1973) *Biochem. Biophys. Acta* 300: 159.