

2 800



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

BIOENSAYO PARA LA DETERMINACION DE UN INHIBIDOR
DE SINTESIS DE PROTEINAS DE TEJIDO DE 'SOLANUM-
TUBEROSUM L'

T E S I S

Que para obtener el Título de

Q U I M I C O

P r e s e n t a

BLANCA LILIA BARQUERA ALCALDE

México, D.F.

1985



EXAMEN DE TITULACION
FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

I N D I C E

Resumen -----	1
Introducción -----	2
Fisiología y Bioquímica de las semillas -----	2
I. Estructura de las semillas angiospermas -----	2
II. Germinación -----	4
III. Metabolismo de la germinación -----	7
IV. Factores que afectan la germinación -----	13
Herida o Envejecimiento -----	16
I. Diferencias ultraestructurales entre tejido fresco y herido -----	18
II. Inducción de enzimas en el tejido herido de reserva -----	20
III. Degradación de enzimas en tejido herido -----	22
IV. Intercambio Iónico -----	25
V. El fenómeno de herida como modelo de estudio -----	28
Antecedentes -----	28
Hipótesis y Objetivos -----	30
Materiales y Métodos -----	32
Resultados y Discusión -----	45
Conclusiones -----	78
Bibliografía -----	79

RESUMEN:

En trabajos anteriores (25), (26) se reportó la presencia de un inhibidor de síntesis de proteínas en tejido herido de papa con aparente carácter proteico. En el presente trabajo se probó la actividad de este inhibidor en otro sistema biológico como es la germinación, la cual es dependiente de la síntesis de proteínas. Se montó este bioensayo y se optimizó para obtener resultados rápidos y confiables.

La actividad del inhibidor se discriminó de otras actividades que podrían causar inhibición de la germinación como son: Actividad de polifenoles, proteasas, RNasa. y carbohidratos. Encontrándose que dicho factor tiene un peso molecular mayor o igual a 12000 daltones, capaz de detener la incorporación in vivo de Leucina tritiada a la síntesis de proteínas en la germinación.

El factor inhibitorio se encuentra en la fracción que precipita entre el 30-60% de sulfato de amonio.

FISIOLOGIA Y BIOQUIMICA DE LAS SEMILLAS

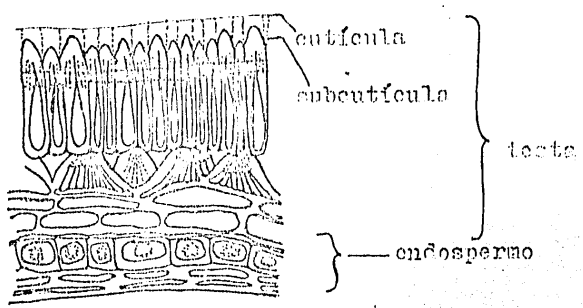
Las semillas son paquetes de energía en un estado de mínima entropía en el ciclo de vida de las plantas superiores. Parte de esa energía se encuentra como información para la germinación, crecimiento, morfogénesis y procreación de una planta completa. Dicha información se encuentra ordenada estructuralmente en la semilla.

Las plantas con semillas pueden clasificarse en dos grupos: Las angiospermas o plantas con flores las cuales tienen como característica que los óvulos y las semillas están contenidos dentro de una estructura cerrada, este tipo de plantas constituyen la clase más avanzada de todo el reino vegetal. Las angiospermas se dividen en dos subclases: Dicotiledóneas y Monocotiledóneas. El segundo grupo de plantas es el de las gimnospermas (coníferas y afines) a diferencia de las angiospermas tienen sus óvulos y semillas expuestos o 'desnudos', de ahí su nombre que significa semilla desnuda. (1)

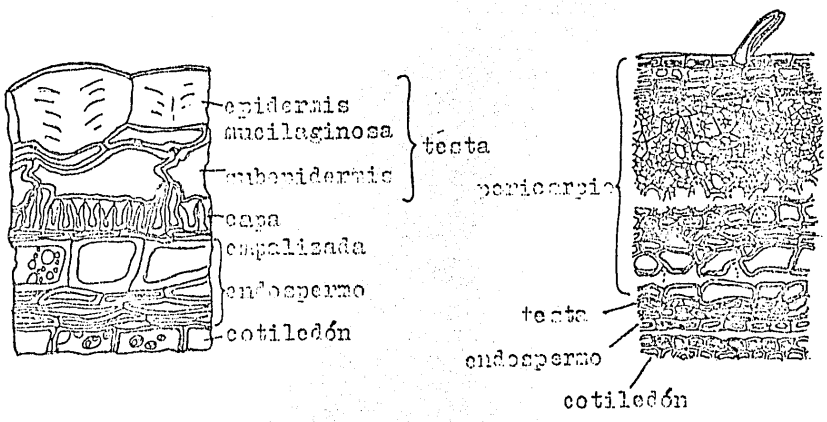
I. Estructura de las semillas angiospermas.

Las semillas de las angiospermas son estructuralmente simples y consisten de las siguientes partes:

Testa. La testa es la envoltura de la semilla originada en la planta madre. Su importancia fisiológica radica en que presenta casi siempre una cutícula, que esta formada por grasa o ceras generalmente, y una o más capas de células protectoras lo que le confiere un cierto grado de impermeabilidad al agua o gases, lo que por supuesto influye en la -



Melilotus alba (Leguminosa)



Sinapis alba
(Crucífera)

Helianthus annuus

Figura 1. Cubiertas de semillas.

regulación del metabolismo y en el crecimiento de la semilla (Fig. 1).(2).

Endospermo. Es el órgano de reserva en donde se encuentra el material que será usado durante la germinación, como almidón, proteínas o hemicelulosas. (2).

Embrión. Aunque el embrión de las angiospermas puede diferir grandemente en apariencia según la especie, todos poseen las mismas partes fundamentales: una radícula, una -

plúmula o epicotilo, uno o dos cotiledones y un hipocotilo que conecta la radícula con el epicotilo. Los cotiledones son hojas temporales que tienen funciones en la digestión, absorción y almacenamiento de alimento en el endospermo. ver Fig.2. (2)

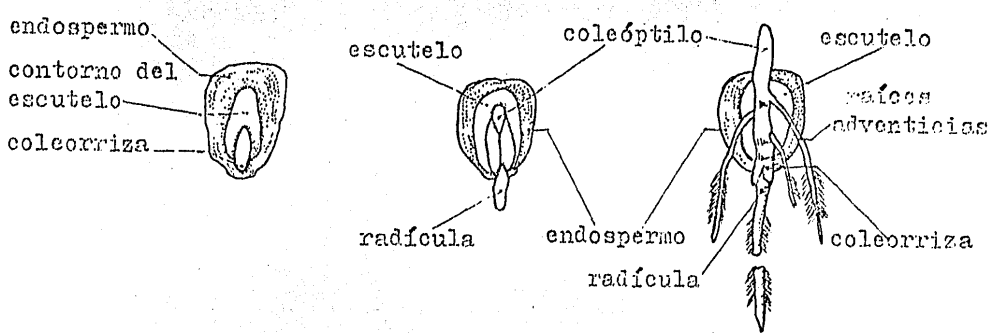
II. Germinación.

La germinación puede definirse de la siguiente forma:

Cuando una semilla es humedecida, toma agua, aumenta su respiración, inicia la síntesis de proteínas y otras actividades metabólicas, después de un cierto período de tiempo el embrión emerge de la semilla y se dice entonces que esta ha germinado. (2).

El proceso de germinación ha sido muy estudiado, probando ser bastante complicado y dependiente de transformaciones físicas y químicas. Puede decirse, en síntesis, que es el paso de un estado quiescente a otro metabólicamente activo. Este proceso puede dividirse en los siguientes eventos:

- 1. Imbibición, que es el fenómeno físico de absorción -



Zea mays

Figura 2. Diagrama de la semilla de maíz en varios pasos de la germinación.

de agua.

2. hidratación y activación.
3. División y expansión celular.
4. Protrucción o salida del embrión de la semilla.
5. Establecimiento del cuerpo primario de la planta.

A continuación se describen algunos de estos eventos. (1) (2).

Imbibición.

El primer evento que ocurre durante la germinación es la toma de agua por la semilla que se conoce como imbibición de la semilla. El grado en que la imbibición se lleva a cabo está determinado por varios factores como son: la composición de la semilla, la permeabilidad de la testa y la disponibilidad del agua, ya sea líquida o gaseosa. La imbibición es un proceso en el cual las sustancias que están dentro de la semilla (algunas de naturaleza coloidal) se hinchan aumentando la presión interior de esta, a la que se llama presión de imbibición. La presión de imbibición determina la ruptura de la testa y es un indicador de la retención de agua en la semilla durante la germinación. Los principales componentes de la semilla que contribuyen al hinchamiento son proteínas, mucílago, parte de la celulosa y sustancias pécicas. El almidón no participa en el proceso. El pH afecta el hinchamiento de las semillas pues las proteínas muestran un mínimo de imbibición en su punto isoelectrico. La constante de disociación de otros coloides está relacionada con el pH.

La imbibición depende también de la temperatura, mientras mayor sea esta, la imbibición es más rápida. Este efecto es complejo, la viscosidad del agua disminuye a medida

que la temperatura aumenta, aumentando también la energía cinética así como la movilidad.

La composición del medio de germinación también influye en la imbibición pues modifica la capacidad del agua para penetrar en la semilla. Por ejemplo, un aumento en la concentración de un soluto disminuye la imbibición por efectos osmóticos. Además en condiciones de salinidad alta, pueden presentarse efectos tóxicos sobre la germinación de la semilla. (3). (4).

La entrada de agua a la semilla está determinada por la permeabilidad de las capas externas de esta. Generalmente la capa de la semilla está formada por membranas selectivamente permeables. Cuando la semilla seca se pone a imbibir existe un periodo corto, en el cual, las membranas no han adquirido su integridad, es decir, se encuentran desarrregladas. Antes de que la integridad de las membranas se restablezca hay un transporte de diversos solutos hacia dentro o hacia fuera de la semilla. (4).

Las membranas se rearreglan a medida de que las semillas se imbiben haciendo más selectivo el transporte a través de ellas. En éstos cambios procede la degradación y síntesis de los componentes de la membrana. (3).

Protrusión y elevación.

La salida del embrión es uno de los eventos cruciales en la germinación. Se lleva a cabo en contra de las capas de la semilla, pero la ruptura de esta no solo involucra la hinchazón por la imbibición. La protrusión se afecta por varios factores ambientales incluyendo el oxígeno, la temperatura, el agua, la luz y diversos cambios tanto en la semilla como en el embrión. El hecho de que la protrusión se a...

fecte por tantos factores, siendo así un fenómeno complejo, tiene ventajas por la reducción de la exposición del embrión a insectos, hongos o al daño mecánico.

Aunque no es general para todas las semillas, lo más común es que la radícula sea el primer órgano que salga de las capas de la semilla. Posterior a la protrusión se realiza la elevación de la plúmula, el hipocotilo forma un especie de "gancho" el cual permite que el meristemo radicle sobre la superficie, el "gancho" se abre y se expone a la luz y lleva la punta de la raíz hacia arriba. Se ha discutido si el evento de la elevación pertenece o no al proceso de la germinación y según la definición que se dió, el desarrollo de la plántula después de la protrusión no pertenece al proceso de la germinación (5).

III. Metabolismo de la germinación.

La semilla seca se caracteriza por una marcada baja actividad metabólica, esto probablemente es el resultado directo de la casi completa ausencia de agua; el contenido es del 5 al 10 %. No obstante esta ausencia de agua, no puede suponerse que el metabolismo de la semilla carezca de potencialidad para el desarrollo. Cuando se rompen semillas secas y se homogenizan en un medio acuoso adecuado, es posible mostrar que en el extracto existe un número considerable de sistemas enzimáticos activos. Puede entonces concluirse que la semilla seca es una unidad funcional bien equipada que es capaz de llevar a cabo un gran número de reacciones bioquímicas con la condición necesaria de una hidratación.

Así los cambios químicos que ocurren durante la germinación son complejos y consisten principalmente de tres tipos: la ruptura de los materiales almacenados en la semilla; el transporte de materiales de una parte a otra de la semilla, especialmente del endospermo al embrión o de los cotiledones a las partes de crecimiento; por último la síntesis de sustancias nuevas a partir de las ya degradadas, en especial la síntesis de proteínas la cual tiene mayor importancia . (1,2,5).

Bioquímica de la Germinación.

Como ya se ha discutido con anterioridad, en el proceso de la germinación se presentan una serie de cambios en los productos de reserva de las semillas, que básicamente consisten en su degradación, muchos de estos productos entran a vías oxidativas para suministrar la energía necesaria para que el proceso de germinación se lleve a cabo. Otros productos, sin embargo, entran a vías de síntesis de metabolitos esenciales para el desarrollo de la plántula. Con estas observaciones se puede asegurar que el metabolismo de la germinación es anfibólico, esto es, se llevan a cabo procesos de degradación de sustancias o catabolismo y procesos de síntesis o anabolismo. Sin embargo, gracias a que en la semilla existe la diferenciación puede notarse que los procesos catabólicos se realizan en los tejidos de reserva, endospermo y cotiledones. Los procesos anabólicos los constituyen principalmente la síntesis de proteínas y la biosíntesis de organelos necesarios para la actividad catabólica realizados en el embrión y en el eje embrionario.(1) (2).

De las vías anabólicas que se pueden encontrar, la síntesis de proteínas es quizá el evento más importante y del cual depende todo el complicado proceso que culmina en parte, en la protrusión de la radícula.

La síntesis de proteínas durante la germinación ha sido detectada principalmente por tres evidencias:

- La aparición de actividad enzimática, o su incremento durante la germinación.
- La ausencia de actividad en presencia de un inhibidor de síntesis de proteínas.
- La incorporación de precursores radioactivos.

La síntesis de proteínas ocurre tan pronto como la imbibición se lleva a cabo activándose el RNA mensajero almacenado. La semilla tiene la capacidad inmediata para sintetizar proteínas y todos los requerimientos para esto se encuentran presentes en la semilla seca. Además se forman enzimas activas por síntesis de novo, que es una evidencia de la activación de proteínas preexistentes durante los primeros estadios de la germinación.

Por tanto se puede decir que la síntesis de proteínas es un requisito para la salida de la radícula de la semilla. Existe la duda de que la síntesis de proteínas depende de RNA mensajero preformado y almacenado, pero es seguro que la síntesis de DNA ocurre solo después de la germinación como parte integral del proceso de crecimiento. (2).

Mecanismo de la síntesis de proteínas.

El entendimiento de la síntesis de proteínas en plantas empieza con los estudios de sistemas libres de células (in vitro), derivados de las semillas; el mate

rial que más se ha usado para estos estudios son embriones aislados de trigo conocidos comercialmente como germen de trigo. (1) (2).

La síntesis de proteínas no se lleva a cabo en la semilla seca, sino que comienza cuando las células están suficientemente hidratadas para permitir que los ribosomas citoplásmicos (80 S) se asocian con el RNA mensajero (RNAm). (1).

Síntesis de proteínas en embriones y ejes imbibidos.

Las técnicas que se utilizaron para la detección de síntesis proteica dependen de la incorporación de aminoácidos radioactivos (^{14}C -Leu ó ^3H -Leu) al crecimiento de la cadena polipeptídica, por tanto es obvio que la disponibilidad de los aminoácidos en el sitio de la síntesis dentro de la semilla puede ser un factor limitante. Así en la semilla intacta el tiempo que toma la imbibición de agua y la concomitante distribución de precursores radiactivos exógenos por todo el tejido puede ser considerablemente más largo en embriones o en ejes embrionarios. La permeabilidad de las capas de la semilla pueden afectar también la entrada de aminoácidos radioactivos. (1).

En ejes embrionarios de Phaseolus lunatus, Phaseolus vulgaris y en embriones aislados de centeno, arroz y trigo la síntesis de proteínas empieza dentro de los primeros 30 o 60 minutos de que se han puesto en agua. Los polisomas, que no se encuentran en la semilla seca, se forman en cuanto empieza la imbibición con la disminución de ribosomas libres. La actividad de los polisom

mas se ha medido en embriones de trigo observando la capacidad de la fracción ribosomal (que contiene tanto ribosomas libres como polisomas) para catalizar la síntesis in vitro de proteínas. El paquete ribosomal de embriones secos es incapaz de llevar a cabo la síntesis (Tabla 1). La toma de agua por el embrión de trigo ocurre rápidamente y después de 10 a 15 minutos la capacidad de síntesis del paquete ribosomal se evidencia.

Los ribosomas presentes en embriones secos o de semilla seca y de órganos de reserva, no se sabe si re tienen la capacidad de síntesis, pero en sistemas a los cuales se ha agregado RNA, así como otros componentes, los ribosomas extraídos de semillas secas pueden llevar a cabo la síntesis de proteínas in vitro.

En sistemas in vitro es necesario agregar ATP (pues en el proceso de obtención de ribosomas se pier-

Tabla 1 . Ribosomas y polisomas en embriones de trigo durante la germinación. (ver ref. 1).

La actividad de los ribosomas fué determinada por la incorporación de leucina a ribosomas aislados. El contenido de polisomas se determinó a partir de la absorbancia en la región de los polisomas en un gradiente de sacarosa.

Tiempo de imbibición	Actividad de ribosomas. cpm/mg de RNA	Contenido de Polisomas. Unidades de D.O.
0	268	0.01
15 min	6680	0.16
30 min	23200	1.61
1.5 h.	31900	2.42
6.0 h	56300	3.66

den o se diluyen las mitocondrias) y componentes esenciales del citoplasma dentro de la fracción sobrenadante (ver tabla 2).

En ausencia de RNAm exógeno el paquete ribosomal extraído de semillas secas de cacahuete es inactivo; - estos resultados se explican por el hecho de que las - semillas secas no contienen RNAm asociado con los ribosomas. En embriones a las 48 horas de imbibición los - ribosomas se han asociado al mensajero y se han formado los polisomas, la adición de RNAm exógeno no es necesaria. (1).

Tabla 2 . Condiciones para la incorporación in vitro de aminoácidos radiactivos en la síntesis de proteínas por ribosomas aislados de semillas secas de cacahuete.

Condiciones del sistema	Incorporación (Cuentas/min/mg de proteína).
1. Sistema completo	2188
2. Sistema completo + cicloheximida	312
3. Sistema sin ATP	90
4. Sin sobrenadante (factores citoplásmicos)	411
5. Sin RNAm	413
6. Sistema completo de semillas imbibidas por 48h, sin RNAm	2480

El sistema completo contiene: 0.3 mg de ribosomas de semillas secas o de semillas imbibidas por 48 h, (líneas 1-5 y 6 respectivamente), 0.8 mg de proteínas del sobrenadante (citoplásmico), 125 μ g de "RNAm", 0.5 μ Ci de 14 C-leucina, 10-15 μ moles/ml de Mg^{2+} . La incubación se llevó a cabo a 37°C por 30 min. Al tubo 1 se le agregó 15 μ g de cicloheximida, la cual es un inhibidor de síntesis de proteínas que actúa sobre los ribosomas 80S. El efecto de omitir ribosomas no se probó. (ver ref. 1).

Las semillas son medianamente resistentes a condiciones externas extremas, con tal de que estén en un estado de desecación. Como resultado de esto, las semillas pueden retener la capacidad de germinar por períodos considerables. El tiempo en el cual las semillas pueden ser viables, es muy variable y depende de las condiciones de almacenamiento y del tipo de semilla. En términos generales la viabilidad se retiene mejor en condiciones en las cuales la actividad metabólica de la semilla es baja, por ejemplo a baja temperatura y altas concentraciones de CO_2 . (1). (5).

Los factores externos que afectan la viabilidad de las semillas pueden considerarse como secundarios si se piensa en el control genético de las mismas. Los factores externos más importantes son: el suministro de agua, la temperatura, los nutrientes minerales y la luz. Para que una semilla pueda germinar, esta debe encontrarse en condiciones ambientales favorables para el proceso.

1. Agua. La parte donde se trata el efecto del agua fue considerada en la imbibición.

2. Gases. Ya que la germinación es un evento que requiere un gasto de energía, la cual es producida por la oxidación en presencia o ausencia de O_2 ; estos procesos involucran el intercambio gaseoso, la salida de CO_2 y la toma de O_2 en el caso de la respiración. Por consecuencia la germinación esta afectada por la composición atmosférica que le rodea. (2).

La mayoría de las semillas tienen un bajo porcentaje de germinación si la tensión de O_2 disminuye de manera apreciable bajo los valores que se presentan en condiciones atmosféricas normales. El efecto del CO_2 es inverso al del oxígeno; la mayoría de las semillas son capaces de germinar si la tensión de CO_2 se incrementa.

la semilla a los casos es debida al aumento de la presión. Aunque se ha visto que a presiones de cerca de las 200 atm no afectan el proceso.

3. Temperatura. La temperatura a la cual una semilla germina varía de una especie a otra. A temperaturas muy bajas o muy elevadas la germinación de las semillas no se presenta. Sin embargo, el cambio de temperatura no afecta a un solo factor de la germinación.

En el rango de temperatura dentro del cual una semilla puede germinar hay un valor óptimo. La temperatura óptima se toma como aquella en la cual se presenta el mas alto porcentaje de germinación en el menor tiempo. La mínima y la máxima temperatura para la germinación son entre las cuales la germinación ocurre.

La temperatura a la cual una semilla germina y el rango dentro del cual es capaz de hacerlo, estan determinados por las características propias de la semilla, diferencias genéticas dentro de la misma especie y la edad. Por ejemplo para el maíz: Mínima 8 a 10°C, óptima de 32 a 35°C, máxima de 40 a 44°C. Aunque el efecto de la temperatura no es independiente de otros factores como por ejemplo la luz. (1) (2).

4. Luz. Entre plantas cultivadas en la luz y otras en la oscuridad hay pocos efectos en la germinación. Las semillas de la mayoría de las plantas cultivadas germinan igual en la luz que en la oscuridad; sin embargo, otras tienen variabilidad en su comportamiento. Las semillas pueden dividirse en, las que germinan en la oscuridad, las que germinan solo bajo luz constante y aquellas a las que no dependen de la iluminación.

De manera estricta puede decirse que los efectos de la luz estan relacionados con el rompimiento de la dormancia o su inducción (2).

Un gran número de sustancias pueden alterar la germinación. Todos estos compuestos son generalmente tóxicos para todos los organismos y, a ciertas concentraciones, detienen la germinación simplemente por que matan a la semilla. El efecto es generalmente irreversible. El simple hecho de colocar una semilla en una solución de presión osmótica elevada, es suficiente para matarla. Las sustancias responsables de altas presiones osmóticas son, sobre todo, azúcar, sales en altas concentraciones como cloruro de sodio, etc. En el laboratorio se usa generalmente manitol. (2).

Otro tipo de inhibición es causada por sustancias que interfieren con ciertas vías metabólicas. Un ejemplo, son los inhibidores de la respiración. Compuestos cianuro, dinitrofenol, azida, fluoruros, hidroxilamina, etc. Otros inhibidores son herbicidas de varios tipos como el 2,4-D. Los compuestos fenólicos de varios tipos pueden inhibir la germinación, los cresoles, por ejemplo, inhiben por su efecto fitotóxico en general.

Dada la gran distribución en plantas y frutos de los compuestos fenólicos, se sugiere que estas sustancias actúan como inhibidores naturales de la germinación.

El efecto de las hormonas vegetales no se discutirá aquí por ser un tema muy extenso (ver 2).

Tabla 3. Inhibición de la germinación de semillas de lechuga. (Ver fig. 6)

COMPUESTO	Conc. para el 50% de inhibición
Catecol	10^{-2} M
Resorcinol	5×10^{-3} M
Ac. cafeico	10^{-2} M
Ac. cumárico	5×10^{-3} M
Ac. salicílico	1.5×10^{-3} M
Ac. gálico	5×10^{-3} M
Pirogalolo	10^{-2} M

HERIDA O ENVEJECIMIENTO

Las plantas están sujetas a varias condiciones o factores ambientales. La acción de estos puede ocasionar la parcial o aún completa destrucción de las plantas. Si el vegetal no es dañado en forma letal es capaz de regenerar el tejido o de protegerse contra el ataque de parásitos y la pérdida de agua, en un proceso involucrado en la respuesta a la herida y en la posterior cicatrización de manera similar al de los animales. Generalmente las células diferenciadas y por tanto especializadas que están debajo de la superficie de la herida, incapaces de dividirse regresan a la actividad mitótica y finalmente forman tejido meristemático. Este meristema en el curso de una nueva fase de diferenciación reemplaza el tejido dañado funcionalmente o produce una capa de tejido que limita la región de la herida, así como un periderma, cerrándose la herida. (7).

La herida y la posterior cicatrización son procesos citofisiológicos que han sido un buen modelo para investigaciones en el desarrollo de la capacidad de las células vegetales. Para esto los tejidos de reserva han sido muy usados, por ejemplo, tubérculos de papa (Solanum tuberosum L), raíces de zanahoria (Daucus carota), tubérculos de alcachofa de Jerusalem (Helianthus tuberosus); camote (Ipomea batatas) y betabel (Beta vulgaris). (7).

El trabajar con tejido de reserva tiene las siguientes ventajas:

- Homogeneidad celular, (el tejido de reserva está compuesto por células parenquimatosas).
- Disponibilidad de fuente de Energía por la ruptura de los polisacáridos de reserva.
- Fácil aplicación de sustancias químicas a fin de estudiar su intervención en el metabolismo.

- Almacenamiento a largo plazo por su baja actividad fisiológica.

- Disponibilidad durante todo el año.

- El incremento de su actividad metabólica es muy marcado lo que facilita su estudio. Esta actividad está relacionada con la biosíntesis de organelos en la respuesta a la herida.

- Su alto contenido de agua lo posibilita a una rápida respuesta. (7) (23).

En forma general se puede decir que existen tres tipos de respuesta a la herida, esta depende de la localización de las células en el tejido y del tejido de reserva que se caté estudiando.

Las células mas cercanas a la herida forman un periderma, esto es, se forma una especie de cicatriz para reemplazar el tejido dañado. El periderma esta formado de sustancias parecidas a la lignina.

Existe otro tipo de respuesta en el cual las células pasan de un estado parenquimático, es decir de baja actividad metabólica, a otro meristemático, metabólicamente activo. Finalmente se ha descrito un tipo de respuesta en donde el tejido pasa a un estado metabólicamente activo aunque las células no son capaces de dividirse.

En muchas plantas de tejido de reserva la reacción a la herida no es la actividad meristemática de las células cercanas al corte. En estos casos las paredes celulares por debajo de la superficie herida empiezan a lignificarse (por ejemplo, en Helianthus tuberosus).

En el caso específico de tejido de papa, al herirse forma un periderma.

Todos los tipos de respuesta a la herida tienen en común que inmediatamente después del corte, el núcleo migra hacia la pared celular, al mismo tiempo, usualmente-

cleo aumenta más o menos en un 50% y la del nucleolo en un 135% en Helianthus tuberosus, los valores correspondientes a la papa son de 168 y 300% respectivamente.

Diferencias ultraestructurales entre tejido fresco y herido.
- Tejido intacto.

Las células de tejido de reserva intacto son generalmente pobres en estructura. Una gran vacuola central llena casi el interior de la célula. El citoplasma contiene pocos organelos, es especialmente pobre en estructuras que lleven a cabo la síntesis de proteínas. El nucleolo contiene pocos o ningún precursor ribosomal. El número de ribosomas y de retículo endoplásmico es bajo.

En forma general se puede decir que el tejido se encuentra en un estado de baja actividad metabólica por la poca cantidad de organelos. (7).

- Tejido herido de tubérculos de papa.

Los cambios estructurales inducidos por la herida pueden describirse refiriéndose solo al caso de la papa. En las células en las que la actividad mitótica regresa después de la herida y que finalmente desarrollan un periderma, pueden observarse los siguientes cambios:

Dentro de las 12 horas posteriores a la herida el citoplasma cambia rápidamente. Entre las 48 y 96 horas el contenido de almidón baja, al mismo tiempo aumenta en forma considerable el número de la mayoría de los organelos. El nucleolo comienza la síntesis de RNA ribosomal. El retículo endoplásmico y el número de membranas con ribosomas unidos se incrementa dentro de las primeras 24 horas posteriores a la herida. Numerosos polisomas se unen al retículo endoplásmico y algunos aparecen en el citoplasma. En consecuencia la actividad metabólica se ve incrementada y la síntesis de proteínas comienza (8). (Ver fig. 3).

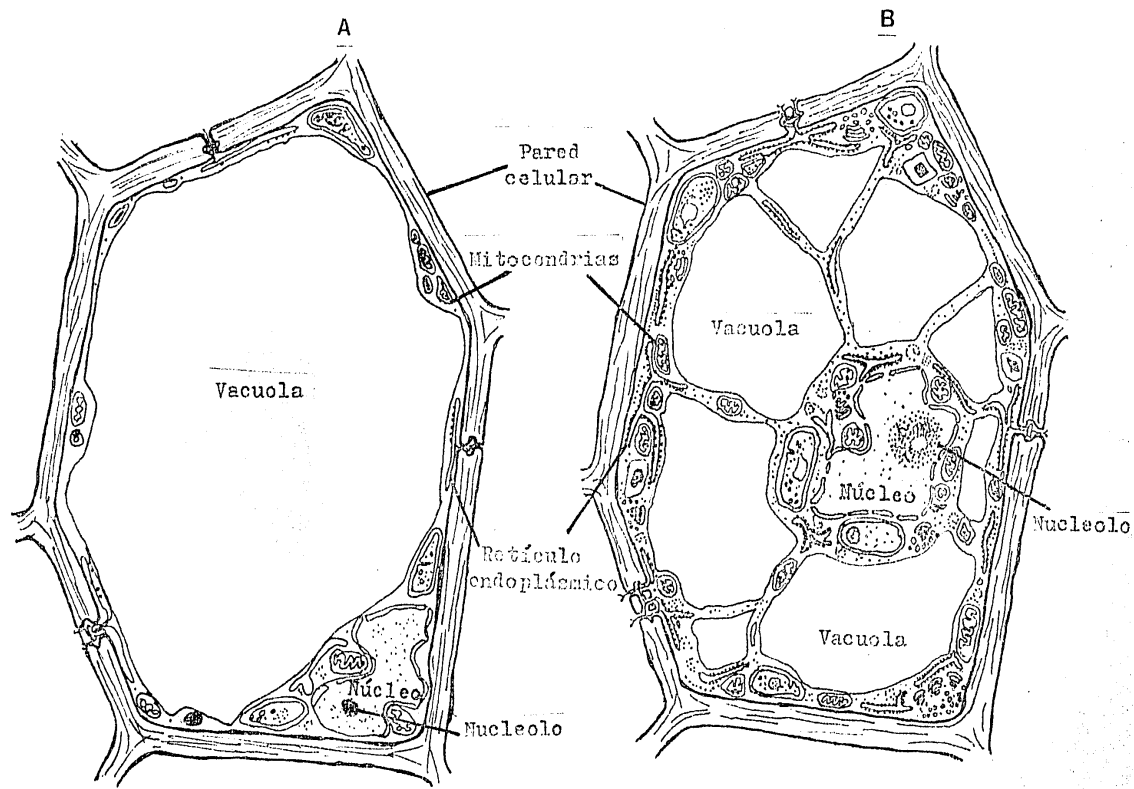


Figura 3. Morfología de la célula de tubérculo de *Solanum tuberosum* L.
 A) Célula de tejido fresco. B) Célula de tejido herido

En el tejido herido las células deben adaptarse a los cambios ambientales, por tanto la actividad de las diferentes enzimas cambia por mecanismos de activación e inactivación de éstas. Dichos mecanismos regulan el número de moléculas de las enzimas así como la relación entre la velocidad de síntesis y su velocidad de degradación. De entre los mecanismos fisicoquímicos de activación e inactivación están: activación e inactivación de enzimas por asociación de subunidades. Activación e inactivación de enzimas por mecanismos alostéricos. Activación e inactivación de enzimas por modificaciones enzimáticas. Activación e inactivación de enzimas por proteólisis limitada. (9) (10).

La inactivación por proteólisis limitada parece ser el inicio de la degradación de la enzima, como se ha demostrado en el caso de mamíferos y para ciertas enzimas del tejido de reserva. (10).

Inducción de enzimas en el tejido herido de reserva.

La herida trae como consecuencia cambios específicos en la actividad de la mayoría de las enzimas. La mayor parte de ellas aumenta su actividad, algunas no reaccionan del todo y otras bajan en su actividad.

Los mecanismos que se mencionan previamente pueden servir para entender los cambios en la actividad de las diversas enzimas.

El incremento en la actividad puede deberse a la activación de enzimas inactivas previamente sintetizadas o a la síntesis de novo de esas proteínas. Ambos mecanismos operan en el tejido herido aunque debe decirse en sentido estricto, que la inducción no es una forma de activación.

Una de las enzimas que se activan es la ribonucleasa (11), (12). De las enzimas que se inducen se encuentran

la fenilalanina amonio liasa (13), las peroxidases (14) y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (15).

- Actividad de RNasa.

En el tejido herido de hoja y de tubérculo de papa hay un incremento de actividad de hidrólisis de RNA alrededor de la herida, que usualmente llega a su máxima actividad a los dos días después de la herida para bajar posteriormente.

Al menos tres diferentes enzimas contribuyen a la degradación de RNA: RNasa, una fosfomonoesterasa ácida y una fosfodiesterasa. La actividad de la fosfodiesterasa no cambia apreciablemente en el transcurso de la herida. En el caso de la RNasa la actividad está regulada a nivel de la transcripción. (11).

- Síntesis de novo de isoenzimas de peroxidases.

En tejido herido de papa y de camote el tejido parenquimatoso tiene actividad de peroxidases. Esta actividad se asocia a la habilidad del tejido de sobrevivir al ataque de fitopatógenos.

El tejido de reserva intacto contiene de 8 a 11 isoenzimas peroxidases. El incremento en el total de la actividad de peroxidases después del corte refleja la activación o síntesis de estas isoenzimas y la aparición de tres nuevas variantes que se sugiere es por síntesis de novo. (14).

- Síntesis de novo de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

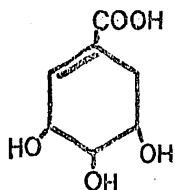
La síntesis de ácidos nucleicos, coenzimas y ácidos grasos en tejido herido presupone la acción de la vía de las pentosas (15). La vía se inicia con dos deshidrogenasas: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, ambas enzimas se activan como consecuencia del corte. Generalmente la actividad se incrementa obteniéndose el máximo entre las 24 y 48 horas después

de la herida, para posteriormente caer tanto en papa como en zanahoria.

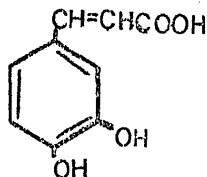
En papa cinco isoenzimas de la glucosa 6- fosfato - deshidrogenasa son sintetizadas de novo, como lo muestra el uso de inhibidores y precursores radiactivos. Estas isoenzimas contribuyen a la actividad total de la enzima.

-Síntesis de novo de fenilalanina amonio liasa (PAL).

Como respuesta a la herida se acumulan una serie de compuestos fenólicos, de los cuales, el ácido chikimico, el ácido cafeico y el ácido cloragénico son importantes.(16).



Acido chikimico



Acido cafeico

La producción de polifenoles en el tejido rebanado de papa blanca se lleva a cabo entre los dos y tres días después de la herida para posteriormente desaparecer.

Dos enzimas son muy importantes en la síntesis de fenoles, la fenilalanina amonio liasa y la ácido transcínámico 4-hidroxilasa que se encuentra tanto en tejido intacto como herido. La actividad de PAL después de la herida se debe a su síntesis de novo como lo han demostrado experimentos con inhibidores de síntesis de proteínas, trazadores radiactivos y ensayos inmunoquímicos (17).

Degradación de enzimas en el tejido herido.

- Fenilalanina amonio liasa.

Como ya se dijo la cantidad de una enzima en una célula eucariótica está regulada por la velocidad de síntesis

y degradación. Generalmente hay una inducción o activación de sistemas específicos de degradación después de la síntesis de novo de una enzima.

La fenilalanina amonio liasa (PAL) se sintetiza de novo después de rebanar el tejido, aumentando considerablemente la actividad de dicha enzima. Después de alcanzar el máximo en la síntesis, la actividad decrece de nuevo. En papa el sistema de degradación aparece un poco antes de que (PAL) llegue al máximo de actividad, esto puede deberse a una actividad proteica. (17). La degradación de PAL no opera en tejido intacto, esta se induce 10-15 horas después de la herida.

- Fosfoglucomutasa (PGM).

En tejido herido de papa, todos o casi todos los átomos de carbono del almidón de reserva se usan para la síntesis de diferentes productos. El almidón es rápidamente degradado hasta llegar a la vía glucolítica y a la vía de las pentosas.

Algunas de las enzimas de la glucólisis son sintetizadas, otras degradadas o inactivadas y otras no tienen ningún cambio como respuesta a la herida (18).

Una de las enzimas más activas en tejido intacto es la fosfoglucomutasa que es rápidamente degradada después de la herida. Se entiende por degradación la desaparición de las isoenzimas y no significa que la degradación de las proteínas se halla probado. El proceso degradativo es dependiente del metabolismo oxidativo, de la traducción y de la transcripción. Por tanto, la síntesis de proteínas es un requisito indispensable para la destrucción de la PGM; esto es la síntesis de proteasas específicas o inespecíficas. (18).

Después de la herida las proteasas son inducidas, las cuales inactivan o degradan las isoenzimas de la PGM, consecuentemente en el tejido intacto las isoenzimas de la -

PGM están físicamente separadas de las proteasas o las proteasas están prácticamente ausentes, mientras que en el tejido herido las proteasas y sus sustratos proteicos están juntos o se induce la formación de nuevas proteasas. En cualquiera de los dos eventos las proteasas, en cierto sentido, pueden reconocer que proteínas degradar. Esto puede ser posible si la proteína está asociada a efectores protectores (sustratos o cofactores), por tanto, la ruptura proteolítica no se lleva a cabo. Después de la pérdida del efector la proteína adquiere una conformación que es reconocida como sustrato por las proteasas. La actividad de proteasas contra PGM ha sido caracterizada. (18).

La mayoría de las proteasas en plantas son enzimas-sulfhidrilo y recientemente se han encontrado endopeptidasas que para su actividad catalítica no requieren de grupos sulfhidrilo, también se han caracterizado proteasas ácidas así como carboxipeptidasas de serina (19). La actividad proteolítica como reportó Pérez (20), en papas máxima alrededor de las 24 horas posteriores a la herida.

Intercambio Iónico.

Cuando se produce una herida en el tejido de reserva se llevan a cabo cambios bioquímicos, fisicoquímicos y morfológicos, entre los cuales se encuentran el incremento de síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, formación de polisomas, membranas e intercambio iónico, (que regula la presión osmótica), considerado como un buen índice de la respuesta a la herida.

Van Steveninck (21), considera que el cambio de concentración de los iones K^+ y Na^+ es el responsable de la regulación osmótica en las células de tejido de reserva en condiciones de baja actividad metabólica y aún en condiciones drásticas como es la herida. Van Steveninck cita que los iones K^+ y Na^+ presentan al inicio del proceso de herida un estado basal, después del cual existe una salida de estos iones a la parte externa del tejido; terminando finalmente con una fase de equilibrio entre los iones externos e internos. Se consideran por tanto tres fases en las cuales hay pérdida de iones por parte del tejido y reabsorción posterior: I. El estado inicial o basal. II. Posteriormente el tejido en un ambiente acuoso y después de ser herido, pierde K^+ y Na^+ , los cuales se encuentran en la solución acuosa externa, presentándose un máximo de concentración de dichos iones. III. Y después ocurre el fenómeno inverso: reabsorción de los iones, por tanto, hay un aumento de la concentración interna de K^+ y Na^+ . Ver fig. 4.

Con respecto al comportamiento del calcio en la respuesta de herida, se ha encontrado que Ca^{2+} no participa directamente en la regulación de la presión osmótica. Sin embargo este ión juega un papel importante en la síntesis de proteínas, pues algunas de las enzimas participantes son dependientes de este ión.

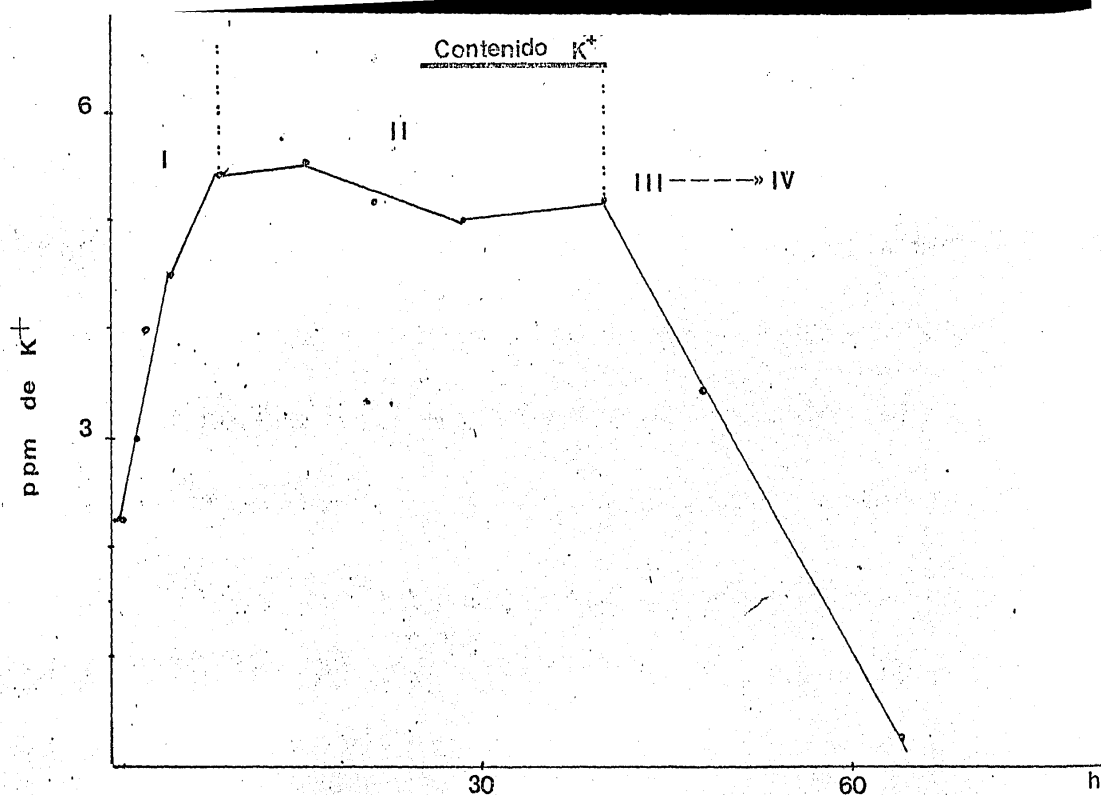


Fig4. Comportamiento descrito por Van Steveninck en la literatura, del intercambio de K^+ en el medio exógeno. (en rebanadas de tejido herido de betabel.)

Resumiendo se puede decir que el fenómeno de herida es el proceso que comprende la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas (estructurales y catalíticas), el intercambio iónico, la formación de membranas, ribosomas, mitocondrias y la activación de las vías metabólicas que intervienen de la degradación de macromoléculas. Además de un proceso de desdiferenciación que conduce a una nueva diferenciación de las células del tejido dañado. El fenómeno de herida (wounding), se le conoce también en la literatura como envejecimiento (aging) o lavado (washing). (18).

El envejecimiento se refiere a los procesos que pueden no ser la causa de la muerte, incluyendo un gran número de cambios en el tejido, estos pueden causar el debilitamiento del organismo aunque no de manera necesaria. La senescencia (fenómeno con el cual se confunde el envejecimiento), en cambio, comprende a todos los procesos deteriorativos o degenerativos que son la causa natural de la muerte del organismo (22).

El corte y lavado del tejido de reserva proporciona un método simple de inducir la diferenciación celular bajo condiciones controladas. La información que resulta de éste método aparentemente artificial y simple ha venido estudiándose desde fines del siglo pasado y gracias a él se conocen fenómenos como: la habilidad de la diferenciación, como ya se dijo, por un proceso de desrepresión del genoma. Además se puede obtener información sobre el control metabólico, la localización de enzimas y organelos, medir potenciales de membrana, gradiente iónicos, etc.(23). El fenómeno de herida implica aspectos difusionales que involucran sustancias regulatorias y componentes de naturaleza hormonal. Se sabe que estas hormonas tienen efectos sobre el fenómeno de desrepresión y sobre la síntesis de proteínas en las rebanadas de tejido.(24). La investigación en el fenómeno de herida puede ayudar a entender la interacción entre el complejo de endomembranas y las funciones de los organelos y proporcionar un conocimiento general sobre la morfogénesis celular. Por tanto este modelo sirve para el estudio de la fisiología y bioquímica vegetal.

El corte y lavado, como se ha visto, causan efectos significativos en todo el comportamiento celular, siendo esta respuesta muy drástica lo que significa una ventaja desde el punto de vista de su estudio. Estos estudios se realizan en tejidos de reserva por las ventajas ya señaladas para obtener resultados.

ANTECEDENTES:

Después del corte del tejido de reserva, una de las respuestas más marcadas es el incremento en la cantidad de proteínas. Este incremento se debe a cambios tanto en

las fracciones ribosomales como citoplásmicas (25). Las causas del aumento en proteínas se puede deber, como Cocotle señala (25):

-Activación de genes, dependiente de la síntesis de RNA y proteínas. Esta actividad se manifiesta por la sin tesis de nuevas enzimas y la activación de vías específi cas.

-Aumento en la concentración de RNA mensajero, formación de polisomas y de factores que se encuentran en el citoplasma.

Estos hechos fueron demostrados por diversos experimen tos (27,28,29), en los cuales usaron cicloheximida, cloral, puromicina y actinomocina D, que inhibien el aumento de la síntesis de proteínas. También se han hecho experimentos -- con la incorporación de aminoácidos radiactivos, tanto in vivo como in vitro (30,31,8).

Utilizando un sistema de traducción in vitro de tubérculos de alcachofa se ha mostrado que en cortes frescos -- la actividad es muy baja y esta aumentaba en discos envejecidos, obteniéndose el máximo a las 24 horas. En este tejido la capacidad de síntesis proteica se ha asociado a fracciones distintas (8).

Estudios realizados por Kahl (8), en papa demuestran que el aumento en la síntesis de proteínas se debe a un -- aumento en la cantidad de RNA mensajero y que los ribosomas del tejido fresco no son inactivos per se sino que ca recen de algún o algunos factores de estimulación.

Por otro lado, Cocotle (25), reporta que existe un -- inhibidor de síntesis de proteínas asociado a ribosomas en el tejido herido de papa, cuya actividad va desapareciendo en razón directa al tiempo de envejecimiento del tejido. En este trabajo se concluye que dicha actividad inhibitoria no se debe exclusivamente a una actividad proteolítica sino como una ineficiencia de los ribosomas de te-

jido fresco por la presencia de dicho inhibidor. También se reportó la presencia de un inhibidor asociado al sobrenadante celular. Por tanto para trabajos posteriores al de Cocotle, -- se planteó la necesidad de realizar bioensayos para saber el efecto fisiológico de estos inhibidores sobre un sistema in vi vo. Para el presente trabajo se escogió el inhibidor asociado en el sobrenadante celular.

Tomando en cuenta estos antecedentes pueden plantearse las siguientes preguntas:

¿ Cuáles son los factores que determinan el paso de un tejido parenquimático a uno meristemático?

¿ Qué mecanismos se llevan a cabo para que el tejido abandone el estado de latencia?

¿Qué papel puede jugar el inhibidor reportado en dichos mecanismos?

En este trabajo se pretende empezar a estudiar este factor inhibitorio y sus propiedades para tener más elementos que nos sirvan en el conocimiento del fenómeno de envejecimiento.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS:

Considerando la presencia de un factor inhibitorio de síntesis de proteínas asociado al tejido de Solanum tuberosum L puede plantear la siguiente hipótesis:

Si existe un inhibidor de síntesis de proteínas este debe ser capaz de inhibir la germinación por ser este proceso dependiente de la síntesis de proteínas.

Objetivos:

- Montaje de un sistema biológico (germinación de maíz) para ensayar la actividad del factor inhibitorio asociado al tejido de papa. Este bioensayo debía cumplir con ciertos requisitos como son: fácil de manejar para obtener resultados rápidos en forma sencilla y confiables.

- Conocer las propiedades de dicho factor, como son su naturaleza química y algunas de sus propiedades físicas.

- Concluir sobre el posible papel del inhibidor en los fenómenos de latencia y envejecimiento.

MATERIALES Y METODOS

I. Materiales.

Reactivos.

-De la casa J.T. Baker:

Acetato de potasio, ácido acético, isopropanol, fenol, etanol, sacarosa, sulfato de cobre, sulfato de sodio.

-De la casa Boehringer Mannheim:

Cloranfenicol.

-De la casa Merck:

Acetato de magnesio, ácido tricloroacético, cianuro de potasio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, 2-mercaptoetanol, molibdato de amonio, ortoarseniato de sodio, PPO(2,5-difeniloxazol,), POPOP (2,2-p-fenilen-bis (5-feniloxazol)), reactivo Folin-Ciocalteu, tolueno, tris(hidroxiaminometano), -tartrato de sodio y potasio, tungstato de sodio.

-De la casa New England Nuclear:

Leucina ^3H (50-60 $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$).

-De la casa Productos Químicos Monterrey:

Cloruro de magnesio.

-De la casa Sankyo Co. LTD:

Ribonucleasa T_1 .

-De la casa Sigma:

Albúmina bovina, caseína, glucosa, L-Leucina, metilcelosolve.

-De la casa Técnica Química:

Bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, ortoarseniato de sodio, ácido sulfúrico.

-De la casa Whatman:

Filtros GF/A de 2.5 cm de diámetro.

Material Biológico.

Papa alfa (Solanum tuberosum L), de tamaño mediano, obtenidas del mercado local, en estado fisiológico latente es decir sin signos de brotamiento.

Semillas de Maíz (Zea mays) de la variedad "Río Bravo Tamaulipas", con un 90-100% de viabilidad. Las semillas se guardaban en frascos con un sobre de cloruro de calcio anhidro.

II. Métodos.

1. Preparación de los extractos de papa.

Los tubérculos de papa se lavaron con agua corriente y después con una solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v), posteriormente se enjuagó con agua destilada.

En condiciones estériles se rebanó el tejido y se cortaron discos de 3 mm de espesor y 19 mm de diámetro usando un rebanador comercial y un cilindro de aluminio; se apartó una cantidad de rebanadas de peso conocido, la cual constituyó el tiempo "cero" (t_0) ó de referencia.

Los discos se pesaron en frascos estériles, (aproximadamente 1.0 g de tejido fresco), los discos ya pesados se lavaron 3 veces con agua destilada estéril con 50 μ g/ml de cloranfenicol; se colocaron en la cámara de incubación que consistía en una caja de Petri de 9 cm de diámetro -- con un papel filtro humedecido con 5 y hasta 10 ml (en el caso de tiempos prolongados de incubación) de solución de cloruro de calcio 100 mM. Las cajas de Petri de los diferentes tiempos se colocaron en una incubadora a $26 \pm 0.1^\circ\text{C}$ bajo iluminación constante.

Tanto el tejido fresco (t_0) ó incubado se homogenizaron en el Politron (PCU-2, Kinematica), con 10 ml de amortiguador de extracción (tris-HCl, 0.15 M, pH=8.5; acetato de magnesio, 0.03 M; cloruro de potasio, 0.06 M; 2-mercaptoetanol, 0.005 M). El homogenado se filtró sobre 3 capas de gasa y el filtrado se centrifugó a 15000 rpm, en una centrífuga Beckman, modelo J2-21, usando un rotor JA-20, por 15 minutos a 4°C . El sobrenadante recolectado constituyó el Extracto crudo. Si el extracto no se usaba inmediatamente se guardaba a -20°C , empleándose solo extractos de menos de 15 días de almacenamiento. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y en tres extractos diferentes.

2. Determinaciones en los extractos de papa.

2.1. Determinación de Proteínas. Método de Lowry. (32).

El método consiste en la formación de un complejo colorido entre el cobre en solución básica y el reactivo de Folin. El cobre forma un complejo con las proteínas en solución básica, entonces este complejo reduce el reactivo de Folin para dar un color azul intenso que puede ser medido espectrofotométricamente.

Se usó de 10-100 μ l de extracto crudo, el cual se mezcló con 50 partes de solución A y una parte de solución B (A es una solución de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 N; B es una mezcla en partes iguales de CuSO_4 al 1% y tartrato de sodio y potasio al 1%), hasta un volumen final de 4 ml. Se esperaron 10 minutos y se agregó 0.4 ml de reactivo Folin diluido con agua (1:2.5), se esperaron 30 minutos y se leyó contra un blanco preparado en la misma forma, pero en lugar del extracto se usó agua; se leyó a 750 nm. De los valores obtenidos de absorbancia se interpolaron en una curva patrón de albúmina bovina.

Método en el que se obtiene la diferencia de absorbancias a 260 y 280 nm. (33).

Este método fue usado cuando las cantidades de proteína no eran detectables por el método de Lowry.

Consistía simplemente en medir directamente de los extractos la densidad óptica a 260 y 280 nm y sustituir los valores en la siguiente igualdad:

$$\text{mg/ml de Proteína} = 1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}$$

2.2. Determinación flamométrica de los iones Ca^{2+} , K^+ y Na^+ .

De los métodos analíticos de espectroscopía de emisión que utilizan la radiación característica del elemento, la flamometría es especialmente útil para los metales alcalinos: sodio, potasio, litio y calcio que tienen energías de excitación bajas.

Cuando una solución de un elemento se nebuliza y excita mediante una llama, se puede establecer una relación entre la intensidad de la emisión y la concentración del elemento en la solución. Esto es posible pues los átomos al ser excitados a niveles superiores de energía tienden a regresar al nivel basal, emitiendo una radiación característica proporcional a la concentración del elemento.

En el flamómetro se usan filtros de absorción característica que transmiten una banda espectral, específica para cada elemento.

Cuando una sustancia se alimenta uniformemente dentro de una flama ocurre la siguiente secuencia de hechos en una rápida sucesión:

El agua u otro solvente, se evapora, produciendo diminutas partículas de sal seca.

En la temperatura alta de la flama, la sal seca se evapora y parte o todas las moléculas gaseosas, se disocian progresivamente para dar átomos neutros que son potencialmente especies emisoras.

Algunos de los átomos del metal libre unidos con los otros radicales se introducen dentro de la flama junto con el elemento de prueba.

Los vapores de los átomos neutros del metal o de las moléculas conteniendo el átomo de un metal, son excitados por la energía térmica de la flama y ocurre la ionización, la cual es registrada.

Se usaron preparaciones de estándares de sales puras de NaCl, KCl y CaCl₂ de una concentración de 1000 mg/ml y las diluciones correspondientes.

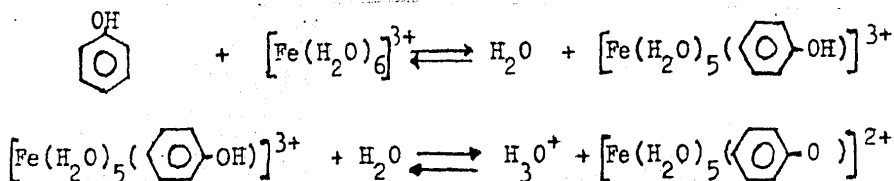
Se preparó el extracto crudo en las condiciones descritas en el punto 1 de Métodos y aparte se hizo una variación: no se colocó solución de cloruro de calcio en el sistema de incubación.

Se trabajó con dos tipos de extracto crudo: exógeno y endógeno. El extracto exógeno consistía el lavado con agua desionizada y estéril de los discos de tejido fresco y herido respectivamente después del término de cada tiempo de incubación. El extracto endógeno consistía el homogenizado del tejido en agua desionizada y estéril además del tratamiento acostumbrado.

A todos los extractos obtenidos se les determinó flourométrico los iones K⁺, Na⁺ y Ca²⁺. Se ensayaron los tiempos: 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 96 horas posteriores a la herida.

2.3. Determinación de Fenoles (34).

El método usado consiste en la formación de un complejo colorido entre el fenol y la sal férrica (FeCl₃ · 6 H₂O), según las siguientes reacciones:



El complejo resultante es de color azul que es el indicio de prueba positiva de la presencia de fenoles.

A 1 ml de extracto crudo de papa se le agregó 1 ml de solución de cloruro férrico 0.1 M, después se leyó espectrofotométricamente a 364.6 nm (longitud de onda donde se obtuvo el máximo de absorción del complejo formado). Se leyó contra un blanco preparado con agua.

Los extractos fueron liofilizados con lo cual se produjo un polvo blanquecino de cada extracto. Se disolvieron 100 mg- de cada extracto en 1 ml de amortiguador de extracción y se - procedió a hacer la prueba de fenoles de nuevo.

2.4. Determinación de Actividad proteolítica (35).

El método usado se basa en la medida de la degradación - de una proteína, caseína, determinando los grupos amino libres, que aparecen en el sobrenadante de la precipitación de la mez- cla de incubación con ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Los- grupos amino se cuantificaron por el método de Rosen (36), que se describe después.

Obtención del extracto.

Se homogenizó el tejido de papa en acetato de potasio -- 50 mM, pH=5.4 con 2-mercaptoetanol 10 mM, posteriormente se - centrifugó a 12000 rpm en una centrífuga J2-21, de Beckman, ro- tor JA-20, durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fué la- fuente de enzima.

Ensayo enzimático de la proteasa.

Se preincubó 1 ml de sustrato (caseína al 0.5% en aceta- to de potasio 50 mM, pH=5.4 con 2-mercaptoetanol 10 mM). Se - agregó 0.5 ml de extracto y se continuó la incubación durante 60 minutos a 30 °C. Para detener la reacción se agregó TCA a- una concentración final de 5% (p/v). Inmediatamente se trans- fiere el sistema a un baño de hielo y se deja ahí por lo menos 2 horas, después de esto se centrifugó a 3000 rpm en la cen- trifuga MSE modelo I-5 durante 20 minutos a 4 °C. El sobrena- dante se usó para hacer la determinación de aminoácidos por - el método de Rosen.

Determinación de aminoácidos por el método de Rosen (36).

A 1 ml del sobrenadante obtenido en el paso anterior se- le agregaron 0.5 ml del amortiguador acetatos-cianuro (aceta- to de potasio 3.5 M, pH=5.4; KCN 5 mM; 1 ml de esta solución- se llevó a 50 ml con amortiguador de acetato de potasio), -

0.5 ml de solución de ninhidrina (solución al 3% en metilcelosolve), se agitó bien, se tapó con canicas y se puso en un baño con agua hirviendo durante 15 minutos. Se dejó enfriar y se le agregó 5 ml de diluyente (solución 1:1 de isopropanol:agua) y cuando estuvieron a temperatura ambiente se leyeron a 570 nm contra un blanco que se preparó en la misma forma, pero con 1 ml de agua en lugar de la muestra. Como estándar se usó leucina a concentraciones entre 0 y 800 nmoles/ml.

Preparación de extractos sin actividad proteolítica.

Para tener extractos de papa libres de proteasas dependientes de sulfhidrilo se procedió a agregar a los extractos PMSF (floruro de fenil metil sulfonilo) en una concentración 5 mM, posteriormente dichos extractos se pasaron por una columna de sephadex G-25 (columna con volumen de cama de ml); esto se hizo con el objeto de separar el PMSF que hubiera quedado libre. Para los ensayos posteriores se tomaron las fracciones de elución de la columna en donde no se detectaba PMSF libre.

2.5. Determinación de la actividad de RNasa (11).

El método para determinar la actividad de RNasa se basa en medir la degradación de RNA en el sistema detectando el aumento de la absorbancia a 260 nm correspondiente al pico máximo de absorción de los nucleótidos libres.

Preparación del tejido.

Se cortaron los discos de papa de la manera antes descrita y se colocaron en la cámara de imbibición con 10 ml de solución de CaCl_2 100 mM a 26°C .

Extracción de la enzima.

Las muestras de tejido se homogeneizaron en 10 ml de amortiguador (Fosfato de potasio 0.02 M pH=7) en el politrón (PCV-2 Kinematica) a velocidad máxima por 2 minutos.-- El homogeneizado se centrifugó a 12,000 rpm (centrífuga mod. J2-21 Beckman con rotor JA-20) por 15 minutos y el sobrenadante se usó como fuente de enzima. Todos los pasos se hicieron a 4°C .

Ensayo de la actividad de la enzima.

Se colocó un volumen necesario de cada extracto ($t_0, t_6, t_{18}, t_{24}, t_{48}$) para obtener una concentración final de proteína de 0.1 mg/ml. Se agregó RNA de levadura en amortiguador de acetato de potasio 0.1 M a pH 5.4 a una concentración de 2 mg/ml y se completó el volumen a 2 ml con el amortiguador de acetato de potasio. Se incubó a 37°C por una hora. Después se tomó de cada extracto una alícuota de 0.5 ml y se agregaron 5 ml de etanol al 95 %, se guardó a 4°C durante toda la noche.

Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm (centrífuga --

Beckman mod. J2-21, rotor JA-20) por 20 minutos y el sobrenadante se leyó a 260 nm en un espectrofotómetro Pye-Uni - cam.

2.6. Hidrólisis básica de proteínas (37).

La hidrólisis se llevó a cabo con un tratamiento con NaOH 13.5 N a 120°C y 15 libras/pulgada² de presión en una autoclave por 20 minutos, posteriormente se dializó con amortiguador de extracción por 12 horas para eliminar los aminoácidos libres y péptidos pequeños. La hidrólisis total de las proteínas se verificó cuando no hubo detección de eg tas por el método de Lowry, en el extracto dializado.

2.7. Determinación de carbohidratos por el método de Nelson

El método se basa en la detección espectrofotométrica del complejo formado entre un azúcar reductor y el arsenomolibdato que tiene una absorción máxima a 520 nm.

Se mezclaron 8 ml de ácido sulfúrico 0.08 N y 5 ml de extracto crudo y se colocaron en un baño de agua a 37°C por 45 minutos.

Después del tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 1 ml y se le agregó, en un tubo 1 ml de tungstato de sodio al 10 %, 5 ml de agua. Se centrifugó a 3000 rpm en una centrifuga MSE mod. L-5. Al sobrenadante se le agregó 1 ml de reactivo cúprico alcalino (24 partes de solución A que contenía carbonato de sodio 0.24 M, tartrato de sodio 0.12M,

bicarbonato de sodio 0.3 M, sulfato de sodio 1.41 M y una parte de B que contiene sulfato de cobre 0.6 M, ácido sulfúrico 0.003 M).

De igual manera se preparan los tubos para la curva patrón de glucosa. El blanco se preparo con 1ml de agua y 1ml del reactivo.

Los tubos tapados se colocaron en un baño de agua hirviente por 20 minutos. Posteriormente se enfriaron en hielo.

A cada tubo se le agregó 1 ml de solución de arsenomolibdato (Molibdato de amonio, 0.47 M, ácido sulfúrico 0.26M, ortoarseniato de sodio, 0.28 M)

Finalmente se leyeron contra el blanco a 520 nm en un espectrofotómetro Pye-Unicam mod. SP-550 y se calculó la concentración de los problemas interpolando en la curva patrón de glucosa.

2.8. Purificación del factor inhibitorio del extracto de papa por precipitación fraccionada con sulfato de amonio (39).

Las sales como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, Na_2SO_4 , K_2PO_4 , etc., afectan la solubilidad de las proteínas pues influyen en la hidratación de la molécula. Cuando se agrega cualquiera de estas sales a la solución de proteínas, menos cantidad de agua está disponible para interaccionar con las proteínas presentes y llega un momento en el cual no hay suficiente agua para mantener en solución un grupo de proteínas, las cuales precipitan. Otros grupos de proteínas podrán precipitar sucesivamente a medida que la concentración de la sal se aumente.

Al extracto de papa se le adicionó en forma sucesiva porciones de sulfato de amonio según la siguiente tabla. - Después de cada adición se separó el precipitado y el sobrenadante por centrifugación y la pastilla se resuspendió en la mínima cantidad de amortiguador de extracción, esta solución se dializó contra el mismo amortiguador por 24 horas, hasta que la concentración de sales fuera igual a la del amortiguador (esta concentración fue medida por conductividad eléctrica).

Cantidad necesaria de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para algunos % de saturación a 25°C. (Ver ref. 39).

% de saturación	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ g/100ml
0-30	17.6
30-60	19.8

3. Incorporación de leucina radiactiva en embriones de maíz (*Zea mays*) variedad "Río Bravo", Tamps.

Se colocó un embrión de semilla de maíz en cada pozo de un microtitulador y se le agregó 100 μl de amortiguador de imbibición (KCl, 50 mM; MgCl_2 , 10 mM; Tris-HCl, 50 mM; sacarosa, 0.2 %; pH 7.6). Se incubó el sistema por 12 horas a 25°C.

Después de las 12 horas se quitó el amortiguador y se agregó 50 μl del mismo amortiguador con 0.5 μCi de ^3H -Leu y se dejó incubar 12 h a 25°C.

Al término de la incubación se sacaron los embriones, se homogeneizaron con amortiguador de imbibición en el politrón (PCV-2, Kinematic) y se centrifugaron a 10,000 rpm (en

centrífuga Beckman mod. J2-21, rotor JA-20) por 10 minutos a 4°C. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 0.1 ml y se le agregó 0.1 ml de ác. tricloroacético al 10 % que contenía leucina fría 1 mM. Se dejó en hielo por 30 minutos.

Se filtro a través de una membrana GF/A (Whatman). las membranas se lavaron con ác. tricloroacético al 5%, con leucina fría y con etanol al 95%. Se dejaron secar.

Cada membrana se colocó en 5 ml de líquido de centelleo (0.269 g de POPOP, 4.31 g de PPO en 900 ml de tolueno) y se determinó el número de cuentas en un contador de centelleo Packard Tri-Carb mod. 3255.

4.-Efecto de los extractos de papa la germinación de semillas y embriones de maíz (Zea mays) variedad "Río Bravo".

Las semillas de maíz se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v) y posteriormente con agua destilada. Se usaron también para algunas determinaciones embriones de la semilla.

La cámara de incubación (para semillas enteras o embriones consistió en una caja Petri de 9 cm de diámetro donde se colocaron 10 semillas o embriones, sobre un papel filtro humedecido. Se agregó el extracto de papa crudo o tratado, en amortiguador de extracción, a diferentes diluciones según el experimento. Se incubó a $26 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ bajo luz constante por 24 horas.

Se usó como control el mismo sistema pero sin extracto y sólo amortiguador de extracción.

NOTA. 1.-Se define viabilidad como la capacidad de germinación en condiciones normales.

2.-El criterio para considerar que una semilla ha germinado es cuando se presenta la protrusión de la radícula.

Los experimentos de germinación se llevaron a cabo por duplicado y con 3 extractos de papa diferentes cada vez.

1. Controles de herida. Cambios en el contenido de proteínas y de iones (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) en tejido herido de Solanum tuberosum L.

Para saber si la respuesta a la herida era la adecuada, según el comportamiento esperado debe presentarse un incremento en el contenido de proteínas; se determinó la cantidad de estas a diferentes horas de incubación del tejido rebanado. Para tal fin se utilizó el método de Lowry (32), usando como patrón albúmina bovina. En la fig. 1 se muestra la curva patrón en la cual se interpolaron los valores de absorbancia de las preparaciones -- problema, para obtener la concentración de proteína de -- estos. Los resultados se muestran en la tabla 1 y en la figura 2. Analizando estos resultados se puede decir que el contenido de proteínas se incrementa en las primeras horas obteniéndose un máximo a las 6 horas (199.47% con respecto al valor inicial); de 12 a 18 horas se mantiene un nivel alto. A partir de las 24 horas la proteína de -- cae rápidamente hasta llegar a valores por debajo del -- tiempo cero (58.5% menor a las 96 horas de incubación).

Este aumento en proteínas puede explicarse como parte de la respuesta a la herida, lo que significa el despertar metabólico del tejido; el paso de un sistema quiescente a uno metabólicamente activo. Por otro lado, el decremento en el contenido de proteínas en horas posteriores, se puede explicar como resultante de la actividad proteolítica que se incrementa después de las 24 horas de incubación del tejido herido. Como se ve dicha -- disminución llega a niveles por debajo del basal.

Con los cambios en el contenido de proteínas puede establecerse el período de tiempo en el cual se manifiesta la respuesta de herida y en que momento se observa el

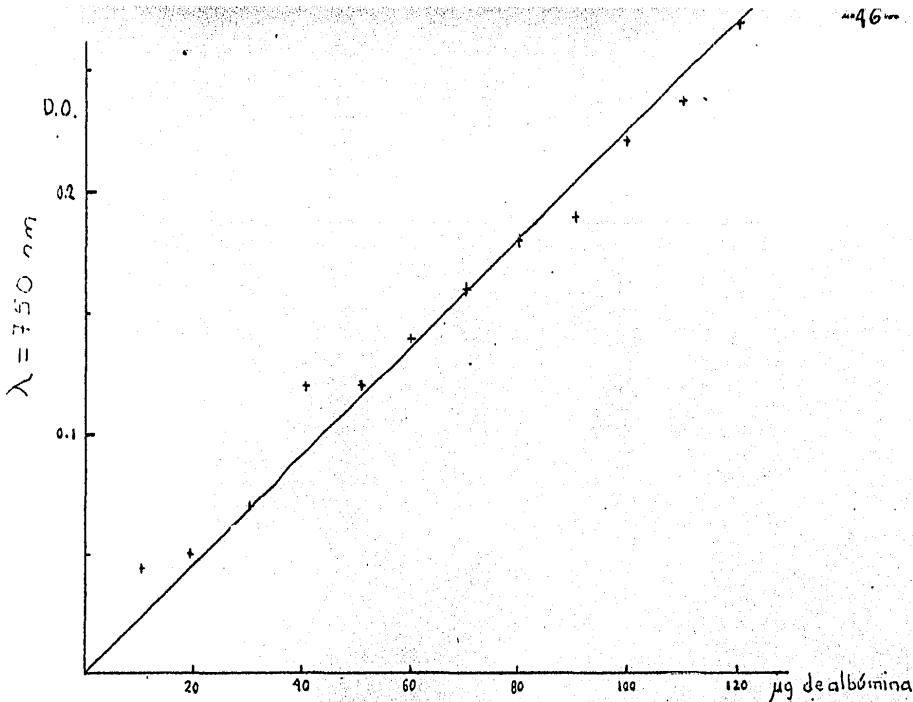


Fig.1. Curva Patrón de proteína (albúmina bovina). Método de Lowry.

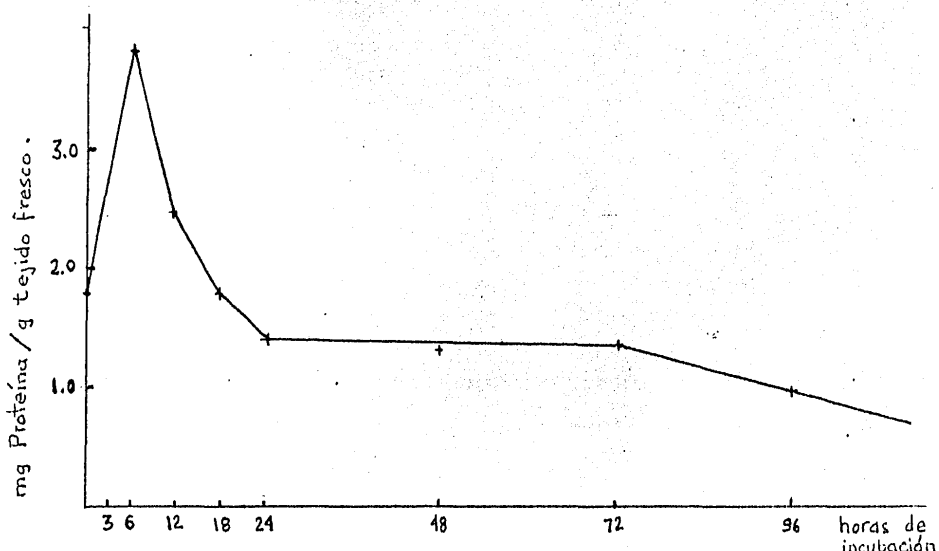


Fig.2. Contenido de proteína en tejido herido de Solanum tuberosum L. Se usó el método de Lowry interpolando los valores de absor-- bancia en la fig.1.

fenómeno de senescencia.

Para comprobar que los datos anteriores reflejaban la respuesta del tejido a la herida, se determinó el intercambio iónico que ha mostrado estar relacionado con el fenómeno de herida. (21). El intercambio iónico se midió cuantificando la concentración de los iones K^+ , Na^+ y Ca^{2+} dentro y fuera del tejido. Como se explicó en la parte de materiales y métodos; la técnica que se usó para la determinación de los iones fué la flamometría.

Observando los resultados puede decirse que durante las primeras horas de incubación del tejido, el transporte potasio y de sodio coincide con el descrito por Van Steveninck (21) aunque en las horas posteriores el comportamiento difiere pues no se recuperan los valores iniciales sobre todo en el caso de Na^+ (fig. 3), pero se logra alcanzar un equilibrio entre el contenido de iones sodio externos e internos.

Tabla 1. Contenido de Proteína en tejido herido de *Salmon trutta* L.

tiempo de incubación en horas.	mg de proteína g de tejido fresco
0	1.88
3	2.40
6	2.76
12	2.44
16	1.89
24	1.37
48	1.26
72	1.25
96	0.79

El contenido de proteína se determinó de los extractos etílicos correspondientes a cada tiempo de incubación a $25 \pm 0.1^\circ C$. El método que se usó para la determinación fué el de Lowry (22), utilizando los valores de proteína en la curva patrón, (fig. 1). Estos resultados están graficados en la fig. 3.

Con respecto al K^+ , (fig.4) se alcanza un nivel de equilibrio más cercano a lo esperado a tiempos superiores a las 48 horas.

En el caso de Ca^{2+} (fig.5), hay una rápida salida del ión en las primeras horas pero después se mantiene constante. Lo que comprueba que Ca^{2+} no participa en el mantenimiento de la presión osmótica. El calcio lo que hace es aumentar la respuesta de herida reflejada en la síntesis de proteínas como se muestra en la fig.6.

Es notable observar que la primera fase de la salida de iones al medio externo y la concomitante disminución de los mismos en el interior del tejido, coinciden con el incremento total de proteínas de las primeras horas, (fig. 2 y 6). Por otro lado, a horas prolongadas de incubación; el comportamiento iónico (Na^+ y K^+) puede explicarse como el principio del fenómeno de senescencia. Estos datos coinciden con el comportamiento reportado para betabel (21) - solo que las fases se presentan en menor tiempo.

De acuerdo con estos resultados de síntesis de proteínas y de intercambio iónico, el tejido de papa responde a la herida en estas condiciones y esa respuesta se verifica dentro de las 24 horas posteriores al corte, que son cuando se presentan los cambios reales, mientras que en tiempos posteriores las membranas se alteran permitiendo alcanzar un equilibrio entre los iones.

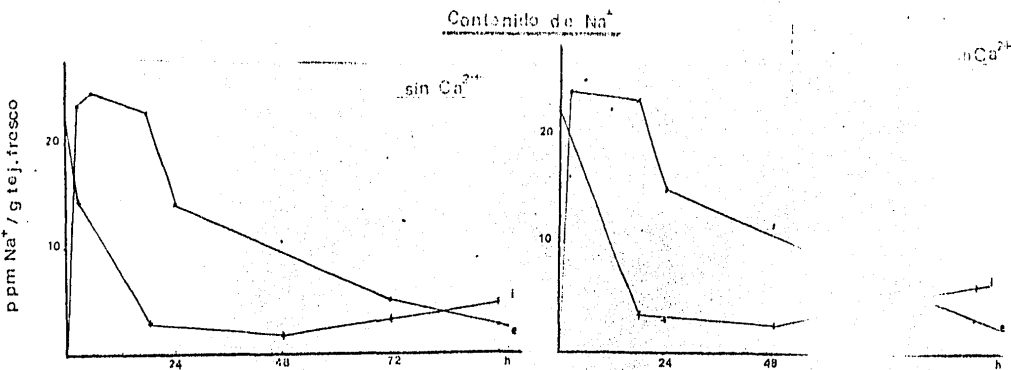


Fig.3. Determinación del contenido de Na⁺ en extractos de tejido herido endógeno (i) y exógeno (e), en ausencia y presencia de Ca²⁺ exógeno.

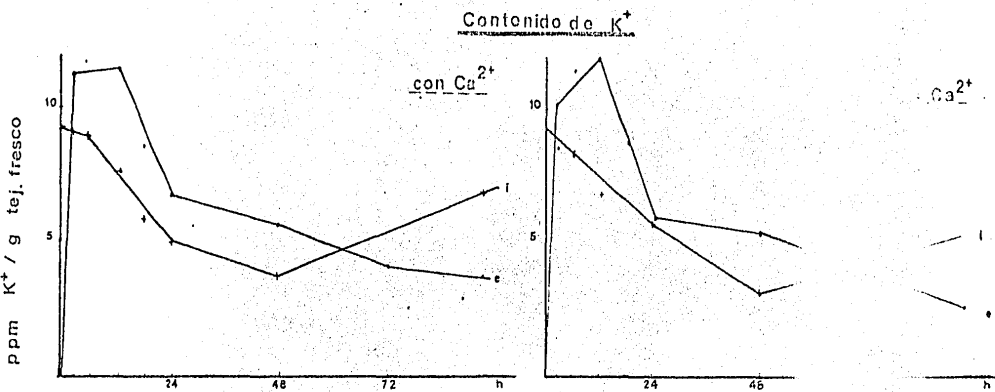


Fig.4. Determinación del contenido de K⁺ en extractos endógenos (i) y exógenos (e) de tejido herido de Solanum tuberosum en ausencia y presencia de Ca²⁺ exógeno.

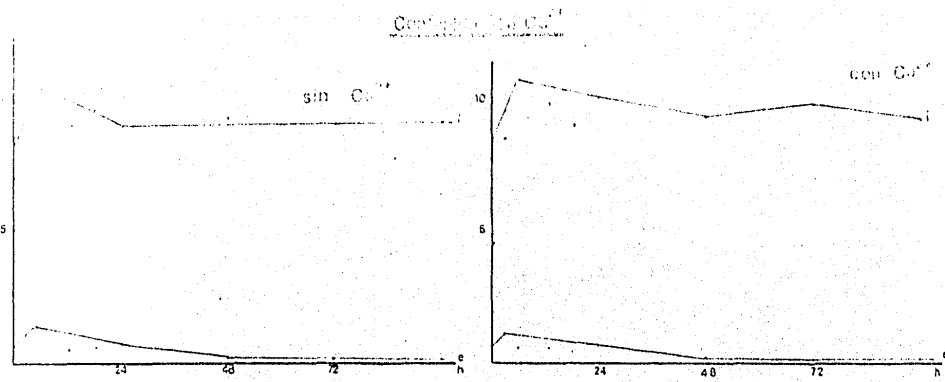


Fig. 5. Contenido de Ca^{2+} en tejido herido de *Solanum tuberosum* L. en presencia y ausencia de Ca^{2+} exógeno, (A) extracto endógeno y (B) extracto exógeno.

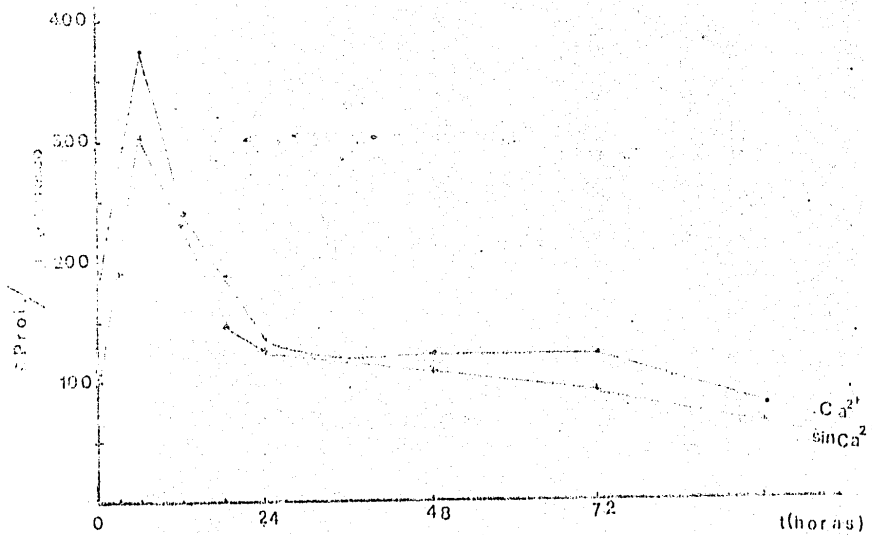


Fig. 6. Contenido de proteínas en extractos de tejido herido de *Solanum tuberosum* L. en presencia y ausencia de Ca^{2+} exógeno, $CaCl_2$ en una concentración 100mM. Para los detalles metodológicos ver el Método de Isary.

maíz, variedad "Rio Bravo Tamaulipas". (Tanto este inciso como el que sigue se realizaron como controles de germinación).

Antes de probar el efecto de los extractos de tejido de papa sobre la germinación de semillas de maíz, fué necesario determinar la viabilidad de las semillas. Este experimento fué indispensable para asegurarse de que en condiciones normales (humedad, temperatura y luz) la semilla germinaría.

Primero se determinó el volumen de agua de imbibición en el cual se obtuviera el máximo de germinación. Se incubaron cinco lotes de 10 semillas cada uno donde se varió la cantidad de agua. Los resultados que se obtuvieron se graficaron relacionando el porcentaje de semillas germinadas contra el volumen de agua de imbibición. (fig.7). Se encontró que con 10 ml de agua se registró un 95% de germinación. Con esta cantidad de agua se incubaron 5 lotes, de -

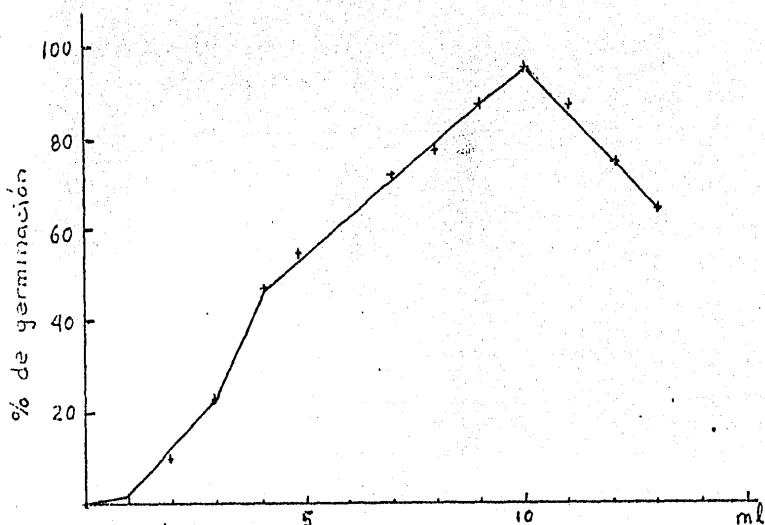


Fig.7. % de Germinación de semillas de maíz (*Zea mays*) en función del volumen de agua de imbibición. Lotes de 10- semillas imbibidas sobre papel filtro en cajas Petri de 9 cm de diámetro a 26 ± 1 °C a luz constante. Durante - 24 horas.

10 semillas cada uno, obteniéndose en promedio un 95% de germinación. En todos los casos la temperatura de incubación fué de $26 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

3. Efecto de la sacarosa sobre la germinación de las semillas de maíz. (Control de germinación.)

Fué necesario comprobar que los efectos del extracto de papa sobre la germinación eran precisamente debidos a tal extracto y no a factores relacionados al tratamiento del tejido como pH, fuerza iónica, presión osmótica, etc.

La presión osmótica del amortiguador de extracción está dada por la sacarosa en una concentración 0.2 M, esta podría ejercer un efecto inhibitorio en la germinación.

Al hacer las pruebas con el amortiguador que contenía sacarosa, se observó que esta inhibía la germinación en un 90% desde concentraciones de 0.025 M; los otros componentes del amortiguador (KCl , MgAc_2 y 2-mercaptoetanol) no tuvieron efecto. Por tanto se trabajó con un amortiguador libre de sacarosa, el cual se usó en todos los experimentos como control. En dicho control las semillas son capaces de germinar entre un 80-90%.

4. Efecto de los extractos de tejido herido de papa sobre la germinación de semillas de maíz.

En los resultados que se muestran en la tabla 2 se observa claramente que entre mayor sea el tiempo de incubación del tejido de papa después de haber sido rebanado, menor es la actividad inhibitoria de los extractos de tales tejidos, medida como % de germinación. Con el extracto del tejido fresco (t_0 ó de referencia) se presenta la máxima actividad inhibitoria obteniéndose el menor % de germinación.

Para los siguientes experimentos se escogió el tiempo t_0 debido a que es el que presenta mayor actividad inhibi

Tabla 2. Efecto de los extractos crudos de tejido herido de *Solanum tuberosum* L. de diferentes horas de incubación sobre la germinación de semillas de *Zea mays*.

1.- Extracto t₀ (tejido fresco).

Concentración de proteína en mg/ml. (1).	% de Germinación (2)
1.880	5
0.940	5
0.376	10
0.188	10
0.0188	15
0.00188	20

2.- Extracto t₆

Concentración de proteína en mg/ml. (1).	% de Germinación (2)
3.760	6
1.880	6
0.752	15
0.376	20
0.0376	25
0.00376	30

3.- Extracto t₁₈

Concentración de proteína en mg/ml. (1).	% de Germinación (2)
1.890	10
0.945	10
0.378	10
0.189	20
0.0189	25
0.00189	30

4.- Extracto t₂₄

Concentración de proteína en mg/ml. (1).	% de Germinación (2)
1.370	10
0.685	10
0.274	20
0.137	30
0.0137	30
0.00137	35

5.- Extracto t₄₈

Concentración de proteína en mg/ml. (1).	% de Germinación (2)
1.260	20
0.630	20
0.252	20
0.126	25
0.0126	25'
0.00126	30

6.- Extracto t₇₂

Concentración de proteína en mg/ml. (1).	% de Germinación (2)
1.25	20
0.625	20
0.250	20
0.125	30
0.0125	35
0.00125	35

7.- Extracto t₉₆

Concentración de proteína en mg/ml. (1).	% de Germinación (2)
0.790	30
0.395	30
0.158	30
0.079	35
0.0079	40
0.00079	40

(1). La concentración de proteína fué determinada por el Método de Lowry (32).

(2). El % de germinación en todos los casos proviene de lotes de 10 semillas, en cada caso se usaron 5 lotes diferentes y se obtuvo el promedio de germinación.

En todos los experimentos se usó como control un sistema que contenía 10 semillas y 10 ml de amortiguador de extracción, donde se obtuvo un 90% de germinación.

Con el amortiguador de extracción se hicieron las diluciones de proteína en todos los casos.

Diferentes investigadores (1,2,5) han encontrado que los polifenoles causan inhibición de la germinación. Además, dichos compuestos se sintetizan en el tejido herido de papa. En este trabajo se planteó la necesidad de cuantificar los polifenoles en los extractos de tejido de papa, con el objeto de ver si existe una relación con la actividad inhibitoria de la germinación.

La técnica que se usó fué la prueba con FeCl_3 que consiste en la formación de un complejo colorido fenol- FeCl_3 que se midió espectrofotométricamente (34) (fig.8), donde se muestra el espectro del complejo. La prueba se hizo directamente en extracto crudo de papa t₀. Los resultados de la prueba fueron negativos por lo que se puede decir que la concentración de los polifenoles está por debajo de lo detectable. Para concentrar los extractos se liofilizaron y muestras de 100 mg se disolvieron en un ml de amortiguador de extracción. Tampoco presentaron concentraciones detectables de polifenoles. Estos resultados son congruentes con lo reportado en la literatura, en el sentido de que los polifenoles se empiezan a detectar a tiempos prolongados de incubación del tejido herido, por consiguiente a tiempos posteriores a las 18 horas las pruebas hubieran resultado positivas (7,13).

Tomando en cuenta la técnica usada y considerando el coeficiente de absortividad molar del complejo estándar Fenol-Fe, ($6.23 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) los polifenoles están por abajo de 10^{-4} M , por otro lado el rango de concentración de polifenoles capaces de inhibir la germinación de semillas de lechuga (6) está entre 10^{-2} y 10^{-3} M . Por lo tanto podemos decir que si existen en el extracto polifenoles estos no contribuyen a la acción inhibitoria de la germinación de semillas de maíz, del extracto de tejido fresco de papa.

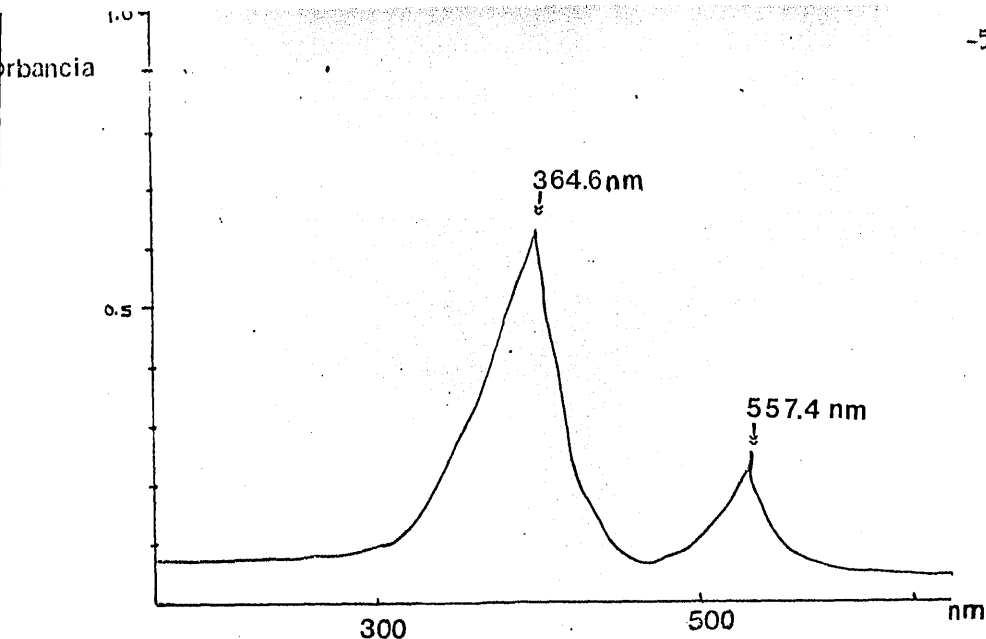


Fig 8 Espectro de Absorción del Complejo Fenol-FeCl₃ (0.1M)

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE FENOLES DEL

EXTRACTO DE TEJIDO FRESCO DE Solanum
tuberosum L.

Extracto: Absorbancia a 364.6nm Absorbancia a 557.4nm

Extracto curdo de papa
to (tejido fresco). 0.001 0.00

Extracto to liofiliz
zado. 100mg disuel-
tos en 1 ml de amor-
tiguador de extrac-
ción. 0.002 0.00

La determinación fué hecha con el método de formación de com-
plejo Fenol-FeCl₃. (ver materiales y métodos).

Para conocer más acerca de la naturaleza del factor-inhibitorio del extracto de papa se procedió a dializar dicho extracto contra el amortiguador de extracción por tres horas. La bolsa de diálisis que se utilizó retiene moléculas de más de 12000 daltones de peso molecular, - por tanto todo lo que quede en el dializado será mayor a ese peso molecular.

Se ensayó la acción del extracto dializado sobre las semillas en germinación. En la tabla 3 se puede notar que el efecto sobre la germinación de maíz es prácticamente el mismo que el del extracto crudo.

Con estos datos se puede deducir que el factor inhibitorio del extracto tiene un peso molecular de 12000 daltones o mayor por lo que no es dializable.

Por otro lado esto podría servir como prueba indirecta de que los polifenoles no son los causantes de la inhibición de la germinación ya que los polifenoles que pudieran estar presentes salen de la bolsa de diálisis.

Tabla 3. Efecto del extracto de tejido fresco de Solanum tuberosum L., dializado, sobre la germinación de semillas de Zea mays.

Concentración de proteína en mg/ml. (1).	% de Germinación (2).
1.500	4
0.900	5
0.360	5
0.180	10
0.018	10
0.0018	10

La diálisis se hizo contra amortiguador de extracción por 2 horas a 4°C.

(1). Las determinaciones de proteína se hicieron después de la diálisis y en la forma acostumbrada. (ver tablas 1 y 2).

(2). El % de germinación se determinó igual que en la tabla 2.

El control usado es igual que el de la tabla 2.

Las diluciones de proteína se hicieron con amortiguador de extracción en todos los casos.

nidos del calentamiento del extracto crudo de tejido fresco de papa sobre la germinación de las semillas de maíz.

Al calentar el extracto crudo de papa se quería observar si el inhibidor era resistente o no al calor. El extracto se calentó a 80°C por 5 minutos en el amortiguador de extracción a pH=8.5. Con este tratamiento se obtuvieron un precipitado y un sobrenadante que fueron separados por centrifugación. El precipitado se resuspendió en la misma cantidad de amortiguador en el que originalmente se encontraba.

Se cuantificó la cantidad de proteínas tanto en el precipitado como en el sobrenadante por el método de Lowry(32). No se encontró proteína en el sobrenadante aún con el método de diferencia de absorbancias a 260 y 280-nm (33), mientras que en el precipitado si se detectó la presencia de proteínas por el método de Lowry.

El sobrenadante se diluyó según se muestra en la tabla 4 y en todos los casos no tuvo efecto en la germinación de las semillas de maíz pues esta se presentó en un 80%. En cambio se probó la actividad del precipitado a diferentes diluciones (de 1:2 a 1:1000) en las semillas de maíz encontrándose que seguía inhibiendo la germinación en un 85%.

Estos resultados sugieren que el factor inhibitorio es de aparente carácter proteico aunque insensible al calor ya que sigue siendo activo aún después de desnaturar las proteínas; recordando que se está trabajando con un extracto crudo pudiera ser que alguna otra sustancia presente fuera la responsable de la inhibición, por ejemplo proteasas dependientes de serina, que son resistentes al calor (19). Esto no puede asegurarse y queda en mera especulación de lo que en realidad sucede.

Tabla 4. Efecto del extracto como inhibidor de la germinación después de su calentamiento previo. Se usó el sobrenadante I y precipitado redisoluelto.

- Efecto del sobrenadante -

Concentración (1)	no	% de germinación (2)
100	0.5	---
10	Proteína	---
1	Proteína	---
0.1	Proteína	---
0.01	(3)	---
0.001		---
0.0001		---

- Efecto del precipitado redisoluelto -

Concentración de proteína (1)	% de germinación (2)
0.050	5
0.025	10
0.010	10
0.005	10
0.00175	10
0.000175	15

- 1.- El sobrenadante y el precipitado se obtuvieron calentando el extracto crudo de tejido fresco a 80°C por 5 minutos en el amortiguador de extracción pH=8.5.
- 2.- El precipitado se redisolvió en amortiguador de extracción.
- 3.- Las diluciones se realizaron con amortiguador de extracción.
- 4.- Igual que en la tabla 2. 5.- La determinación de proteína es igual que en las tablas 1, 2 y 3.

Estos datos son, en cierta forma contradictorios a los obtenidos por Cocotle(25), pero hay que recordar que la forma de medición de la actividad inhibitoria es diferente, pH diferentes y sistemas de diferente origen.

P. Actividad proteolítica

Dado que Pérez (20) reportó que los extractos de tejido de papa tenían actividad proteolítica y aunque en el tejido fresco esta actividad era muy baja, surgió la duda de que la actividad inhibitoria en la germinación se debiera a dicha proteólisis.

Se determinó la actividad proteolítica del extracto de papa, incubándolo con caseína como sustrato, variando la concentración de proteína del extracto, según el método de Feller (35) y al final de la incubación se determinaron los grupos amino libre producto de la proteólisis, esto se hizo con el método de la ninhidrina de Rosen (36) y usando como patrón leucina (fig.9). Se usó la concentración de caseína de saturación (fig.10) para los experimentos.

Como se observa en los resultados que se encuentran en la tabla 5, el extracto presenta una actividad proteolítica dependiente de la concentración de la enzima, esta actividad es baja comparándola con la que presentan los extractos de tejido con más tiempo de incubación obteniéndose un máximo a las 48 horas posteriores al daño (20).

Experimentos anteriores llevados a cabo en el laboratorio (25) sugieren que la actividad inhibitoria del extracto no está dada, en forma apreciable, por actividad proteolítica. En el presente trabajo se pensó incubar las semillas de maíz en presencia de un extracto que no tuviera actividad proteolítica, esto se lograría agregando PMSF (fluoruro de fenil metil sulfonilo), el cual es un inhibidor de proteasas dependientes de sulfhidrilo. En condiciones de inhibición de proteasas con 5 mM de PMSF (se usó esta concentración de PMSF pues era la mínima detectada espectrofotométricamente a 271 nm), se hizo reaccionar con un extracto curdo de papa que contenía 0.65 mg de proteína/ml y posteriormente se aplicó a una columna de sephadex G-25 para eliminar todo el PMSF LIBRE y molécu

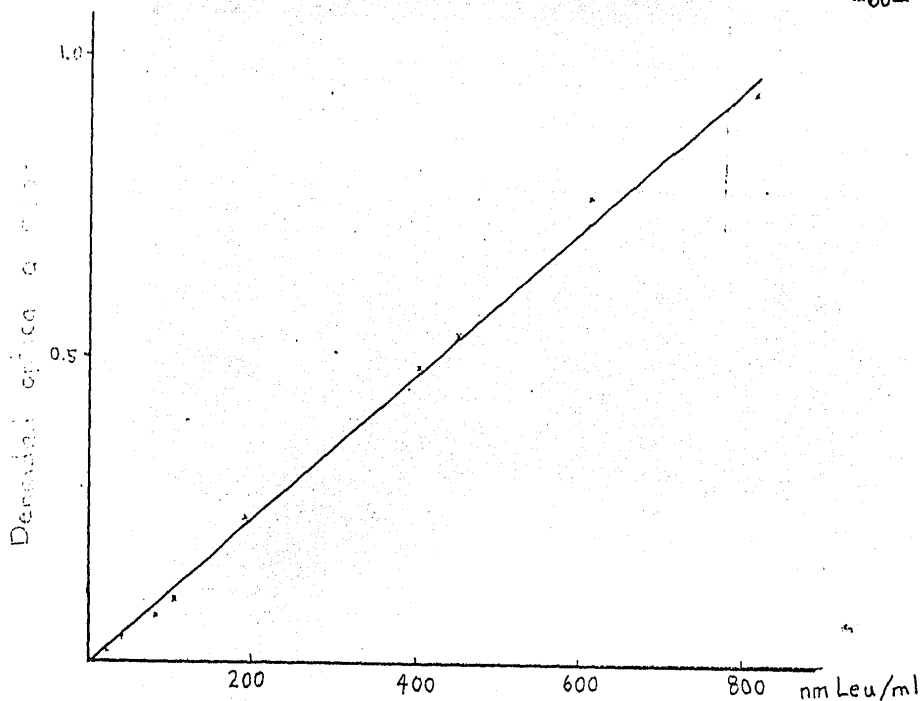


Fig. 9. Curva patrón de Leucina. Método de Rosen (36).

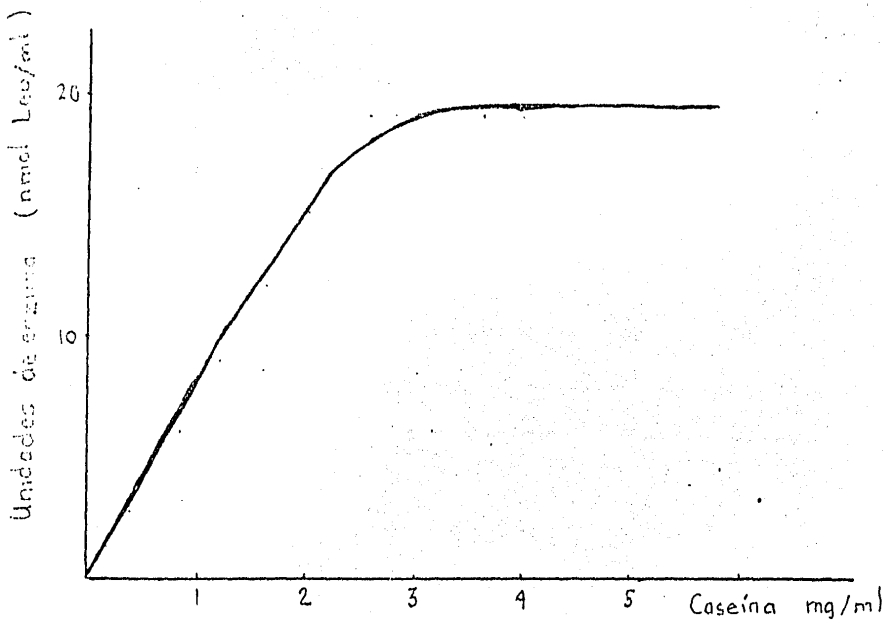


Fig. 10. Curva de saturación de actividad proteolítica de extracto de tejido fresco de papa. Concentración del extracto 0.26 mg/ml. Para detalles ver Materiales y Métodos.

las de peso molecular elevado (12000 daltones o más). (Se muestran las curvas de elución en las figuras 11, 12, 13),

De esta manera se eliminaba el PMSF libre que era capaz por si mismo de inhibir la germinación. Con el extracto resultante eluido de la columna (fracciones de la 15 en adelante, fig. 12, 13), que contenía la proteína con PMSF unido covalentemente unido a las proteasas se determinó el efecto sobre la germinación y se encontró que era prácticamente el mismo que el del extracto crudo con actividad proteolítica no inhibida. (Tabla 6). Puede decirse entonces que la actividad proteolítica del extracto de papa poco interviene en la inhibición de la germinación de semillas de maíz. (se está hablando de proteasas dependientes de sulfhidrilo.).

... en el ...

Concentración de proteína en mg/ml. (1)	% de Germinación (2)
1.20	5
0.60	5
0.24	7
0.12	10
0.012	15
0.0012	25

... de ...
 ... de ...
 ... de ...
 ... de ...
 ... de ...

Tabla 6 Efecto del extracto crudo de tejido fresco de *Solanum tuberosum* L, tratado con PMSP 5 mM y pasado por una columna de sephadex G-25, sobre la germinación

Concentración de proteína en mg/ml. (1)	% de Germinación (2)
1.20	5
0.60	5
0.24	7
0.12	10
0.012	15
0.0012	25

(1) La concentración de proteína se determinó por el método ya descrito, después del tratamiento con PMSP.
 (2) Igual que en la tabla 2.

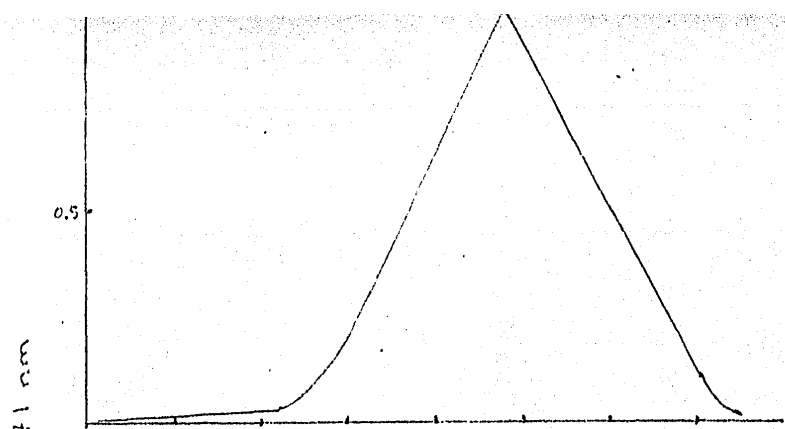


Fig. 11. Curva de elución de BSA (fluoruro de fenil metil sulfonio) 5%.

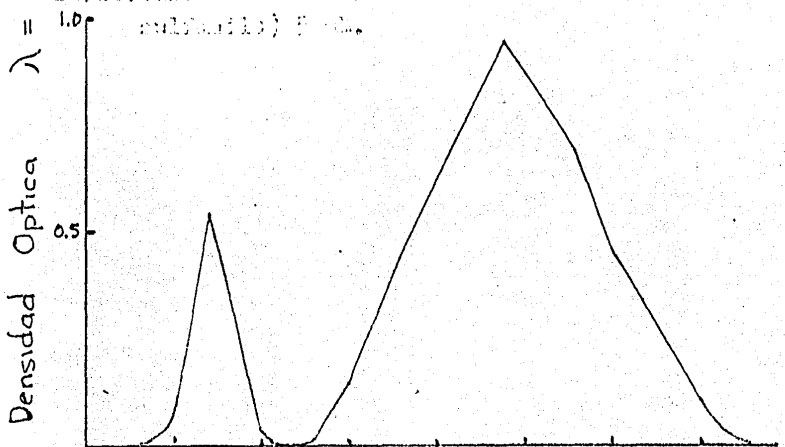


Fig. 12. Curva de elución de suero albúmina bovina (100 mg/l) con BMSF 5%.

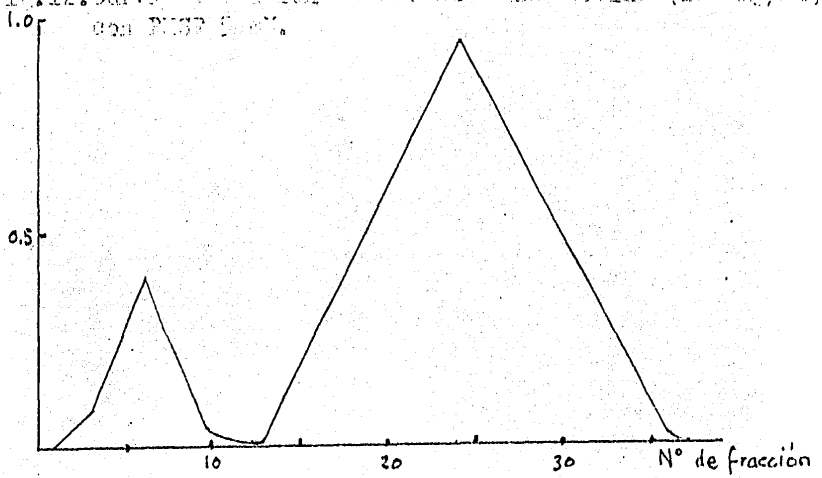


Fig. 13. Curva de elución de extracto crudo (t_0) (1.3 mg/ml de proteínas) y BMSF 5%. En los tres casos se usó una columna con Sephadex G-25 y un scintilador con Tria de pH 6.5, 9.01 V; T21 1.00 V; T402 0.03 V y 2-agregaciones 2.005 V.

9. Determinación de RNasa en los extractos de papa

Una de las enzimas que se activan como respuesta a la herida en el tejido de papa es la RNasa por tanto era necesario descartar si el efecto inhibitorio en la germinación fuese debido a esta enzima por degradar el RNA de la semilla. Se midió la actividad de la enzima en el extracto así como la cantidad equivalente a esta enzima del extracto con una cantidad comparativamente igual en la capacidad para inhibir la germinación.

Se encontró que la actividad de RNasa se incrementa conforme transcurre el tiempo de incubación del tejido de papa después de la herida, obteniéndose un máximo a las 24 horas, tal como se ha reportado en la literatura (Tabla 7 y fig. 14).

Se ensayó el efecto de RNasa T_1 de levadura sobre la germinación de maíz a concentraciones equivalentes a las actividades de RNasa en los extractos de papa correspondientes a los tiempos de incubación 0, 3, 6, 18, 24 y 48 horas. La RNasa ensayada no tuvo efecto en la germinación de maíz en donde se usaron cantidades equivalentes a 0, 3, 6 y hasta 18 horas de incubación del tejido de papa, pues la germinación se presentó hasta en un 80% (Tabla 8). Puede observarse que ha medida que se aumenta la concentración de RNasa el % de germinación disminuye, por lo que al llegar al valor máximo de unidades de RNasa el % de germinación es mínimo. (10%).

Tabla 7. Determinación de la actividad de RNasa en tejido herido de Solanum tuberosum L.

Tiempo de incubación del tejido en horas	Unidades de actividad (1)	Actividad por proteína (2)
0	0.6352	6.312
3	0.7197	7.197
6	0.8896	8.889
18	1.1383	11.383
24	1.3163	13.163
48	0.9731	9.731

Para la determinación se usaron dos amortiguadores diferentes: para homogeneizar, amortiguador de fosfatos 0.02 M y 2-mercaptoetanol 0.01 M a pH=7; para la medición de la actividad, amortiguador acetato pH=5.4. En todos los casos la cantidad de proteína ensayada fué de 0.1 mg/ml. Se definió una unidad de enzima de la siguiente forma:

$$(1) \text{Unidades} = \frac{A_{260} (\text{ml de solución ensayada} + \text{ml precipitante}) F}{(\text{ml de enzima})(\text{Tiempo de incubación})}$$

F= Factor de dilución.

(2) Unidades/0.1 mg de proteína ensayada.

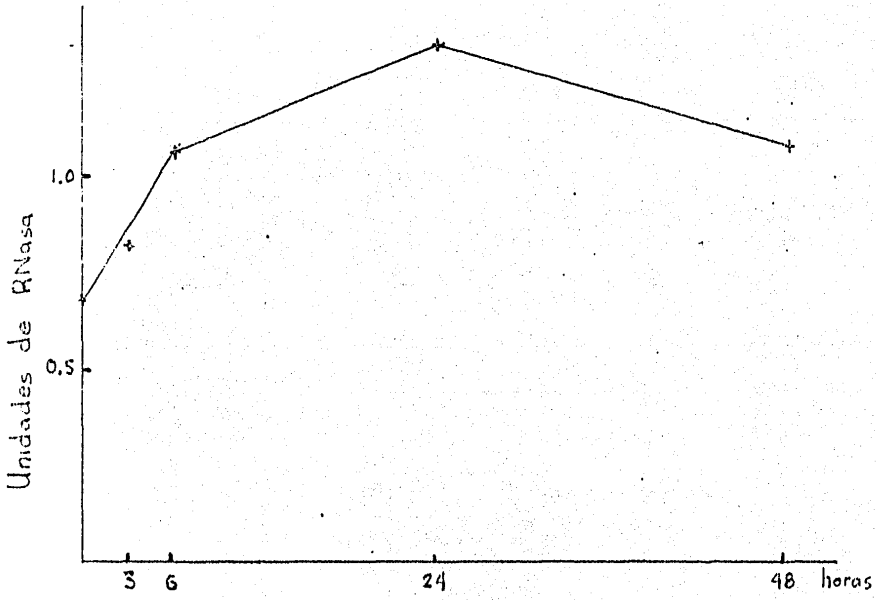


Fig. 14 . Niveles de actividad de RNasa en tejido herido de Solanum tuberosum L. a diferentes horas de incubación posteriores a la herida. Para ver condiciones del experimento ver

Unidades de RNasa. (1) RNasa "1	Extracto correspondiente (2).	% de Germinación. (3).
6.352	t_0	80
7.197	t_3	80
8.889	t_6	73
11.383	t_{18}	20
13.163	t_{24}	10
9.731	t_{48}	72

(1) Las unidades de RNasa se definen como en la tabla 7. Dichas unidades corresponden en cada caso a las de los extractos de tejido fresco y herido de papa.

(2) Se indican las horas de incubación del tejido en las condiciones especificadas en materiales y métodos.

(3) Igual que en la tabla 2.

10.- Efecto de los extractos de tejido de papa sobre la germinación de semillas previamente imbibidas.

Un experimento que se hizo para saber si el factor inhibitorio penetraba en la semilla fué la previa imbibición de estas en agua. Con esto las membranas de la semilla se debían reorganizar no permitiendo la entrada del factor inhibitorio del extracto de papa a esta y por tanto permitiéndose la germinación.

Si el extracto que contiene el factor inhibitorio se agrega desde el principio de la imbibición (como se hizo en los experimentos previos) el factor puede penetrar a través de las membranas desarregladas, resultando en que las semillas no germinan.

Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 9 donde se puede observar el efecto determinante de la previa imbibición de las semillas. Se nota claramente que en estos casos el factor inhibitorio no tiene ningún efecto sobre la germinación presentándose

no inhibidas la germinación se inhibe un 93%. En el caso en que se agregó EUSA la germinación se presentó con o sin inhibición previa en un 80%. Esto último puede deberse a que la EUSA no entra a la semilla o que la cantidad encayala no sea suficiente para detener la germinación.

De cualquier forma este experimento es un claro control de la manera de acción del inhibidor sobre las semillas.

Tabla 9.. Efecto de la inhibición previa de las semillas de Zea mays⁺ sobre la actividad de los diferentes extractos (de tejido fresco) de Solanum tuberosum L.

Tratamiento dado al extracto.	% de Germinación (3)	
	Semillas embibidas	Semillas sin embibir.
Grado	86	10
Treado con EUSF (5 mM) y pasado por una columna de Sephadex G-25.	84	12
Cantidad equivalente de EUSA T ₁ (6.352 U) (1)	80	30
Extracto crudo dializado. (2)	84	10

(1) Las unidades se definen como en la tabla 7. Este valor corresponde al tejido fresco de papa.

(2) El extracto fué tratado igual que en la tabla 3.

(3) Igual que en la tabla 2.

Se usó como control el sistema de germinación en amortiguador de extracción, donde el % de germinación es del 90%.

+ Las semillas de maíz embibidas en agua por 6 horas a 30°C.

Para establecer la naturaleza química del factor inhibitorio se hicieron los siguientes experimentos.

Partiendo del extracto crudo (t_0) se determinaron proteínas por el método de Lowry y actividad proteolítica (Ver materiales y métodos).

Se hizo una precipitación fraccionada con sulfato de amonio y se localizó la fracción inhibitoria la que precipito con 30-60% de la sal. En el precipitado se encuentran no solo proteínas sino también carbohidratos, aunque estos no precipitan en forma selectiva. A cada fracción obtenida se le determinó la cantidad de proteína (método de la diferencia de absorbancias), la actividad proteolítica y la actividad de RNasa.

Los resultados encontrados se muestran en la tabla 10, donde se observa que la actividad de RNasa se concentra en el sobrenadante y corresponde al 97.52% de la actividad de RNasa del extracto crudo. La actividad de proteasas se encuentra en su mayor parte en la frac-

Tabla 10. Determinaciones sobre las fracciones obtenidas por la precipitación con sulfato de amonio de tejido fresco de Solanum tuberosum L.

	Proteínas (1)	Unidades de proteasa (2)	Act. esp. (3)	Unidades de RNasa (4)	Act. esp. (5)
Extracto crudo	1.32	15.03	11.562	0.6352	6.352
Fracciones obtenidas con sulfato de amonio % de la sal					
0 - 30%	0.279	4.04	14.48	0	0
30 - 60%	0.800	0.410	0.51	0	0
Sobrenadante	0.260	9.360	36.00	0.620	6.20

(1) en mg/ml. Determinadas por el método de Lowry.

(2) en nmoles de Leu/ min, según la tabla 5.

(3) en U/mg de proteína en el caso del extracto crudo la proteína que fué usada para la determinación fué de 0.65 mg/ml.

(4) Las unidades se definieron como en la tabla 7

(5) La actividad específica es U/0.1 mg de proteína ensayada en cada

ción sobrenadante y parte en la fracción 0-30% de la gel, para que una cantidad relativamente pequeña se encuentre en la fracción 30-60% de sulfato de amonio. Posteriormente se probó el efecto de cada fracción sobre la germinación de las semillas de maíz. Los resultados se muestran en la primera parte de la tabla 11, donde se ve que la fracción 30-60% de sulfato de amonio presenta una inhibición de la germinación del 90-95%. Aunque la otra fracción (0-30%) y el sobrenadante inhiben pero no en forma tan marcada, de un 30-35%; esto puede deberse a actividad proteolítica concentrada en dichas fracciones.

Posteriormente a un extracto crudo se le agregó PVST 5 mM, se aplicó a la columna de sephadex G-25 y el eluido finalmente se fraccionó con sulfato de amonio; las fracciones así obtenidas se probaron en el sistema de germinación y se observó que la fracción 30-60% de sulfato de amonio seguía presentando inhibición de la germinación, las otras fracciones (0-30% de sulfato de amonio y el sobrenadante), sin embargo, no presentaban inhibición de la germinación, las semillas germinaron hasta en un 70%. (segunda parte Tabla 11).

Con este resultado se puede decir que la actividad inhibitoria no se debe a proteasas dependientes de sulfhidrilo (que son las que inhibe el PVST), además que esta actividad inhibitoria no es causada por RNasa, pero no se descarta la posibilidad de que el factor inhibitorio sea de naturaleza proteica o de carbohidrato pues es capaz de precipitar al agregarle cantidades variables de sulfato de amonio.

12. Determinación de carbohidratos en el extracto de papa.

Para saber si los carbohidratos presentes en el extracto eran los responsables de la inhibición de la germinación, se degradaron las proteínas presentes para tener solo carbohidratos. Para esto se hizo una hidrólisis básica (ver materiales y métodos) y se determinó la cantidad de carbohidratos por el método de Nelson (36) en el cual se usó como referencia glucosa (Fig. 14).

11. (ver parte). Efecto de las diferentes fracciones obtenidas con la precipitación con sulfato de amonio del extracto de tejido fresco de Salmon trutta sobre la germinación de los coqueles de Amphip.

Concentración de proteína (1)	Germinación (%) (2)
0.070	5
0.075	35
0.0819	64
0.090	5
0.095	5
0.099	10
0.106	75
0.099	50
0.125	55

Tabla 11. (ver parte). Efecto de las diferentes fracciones obtenidas con la precipitación con sulfato de amonio sobre la germinación de coqueles de Amphip. El extracto crudo antes de la precipitación se trató con PVP 5 M y se usó un método de concentración de proteínas por el PVP 10%.

Concentración de proteína (1)	Germinación (%) (2)
0.070	70
0.075	70
0.0819	75
0.090	5
0.095	5
0.099	5
0.106	70
0.099	70
0.125	70

(1) Concentraciones de proteína determinada por el método de diferencia de absorbancias a 260 y 280 nm (33).

(2) Igual que en la tabla 2.

(3) Concentración de proteína medida después del tratamiento con PVP, se usó el método de la diferencia de absorbancias a 260 y 280 nm.

Los resultados se muestran en la tabla 12 donde se observa que la cantidad de carbohidatos de cada fracción es muy parecida. Posteriormente se probó el efecto de las diferentes fracciones hidroilizadas (que solo contienen pentosidos) sobre la germinación, observándose que en todos los casos esta se presenta en un 75%; se puede decir entonces - que la inhibición de la germinación es mínima con respecto a la fracción inhibitoria (30-60% de sulfato de amonio sin tratamiento de hidrólisis básica). (Tabla 13).

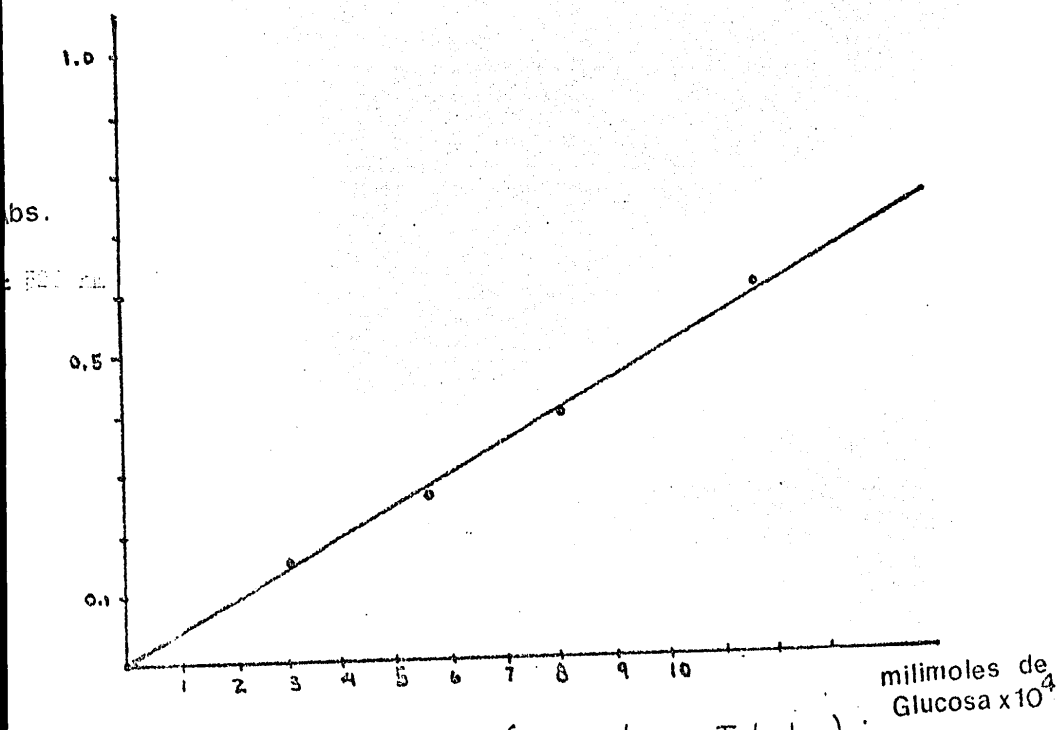


Fig.14 CURVA PATRON (Reductores Totales)

(Método de Nelson)

a las proteínas, obteniendo extractos libres de ellas y solo con carbohidratos, hace que la propiedad inhibitoria de dichos extractos, en especial de la fracción 30-60% de sulfato de amonio, desaparezca. Esto hace suponer que los carbohidratos no son los responsables de la acción inhibitoria en la germinación del maíz.

Estos resultados nos hacen postular que el factor inhibitorio puede ser de carácter proteico aunque no se trata ni de RNasa ni de proteasas dependientes de sulfhidrilo, al menos en las condiciones en que se trabajó. Además, aunque no puede decirse si el factor inhibitorio de aparente carácter proteico está asociado o no a un carbohidrato, si puede afirmarse que al tener un extracto o fracción libre de proteínas la actividad inhibitoria se pierde.

Tabla 12. Germinación de Zea mays en el extracto de tejido fresco y en las fracciones obtenidas al precipitar con sulfato de amonio.

	Concentración de carbohidratos expresada como sacarosa/g. de glucosa/ml.
Extrato fresco	4.45×10^{-2}
Fracción precipitada con NH_4SO_4 (20%)	
0-10	1.1×10^{-2}
10-60	1.45×10^{-2}
Fracción libre (30)	1.7×10^{-2}

El extracto fresco se germinó en la solución de sacarosa 10% y 10 ml. En las fracciones se usó un intervalo en la curva de germinación (21 y 24). El método usado fue el de Nelson, dando como resultado germinaciones totales (100%).

Tabla 13. Efecto de las fracciones obtenidas al precipitar con sulfato de amonio el extracto de tejido fresco de Zea mays en la germinación de Zea mays en la solución de sacarosa.

tes.	% de sacarosa	% de germinación (2)
Extrato fresco	10	75
Extrato fresco	10	75
Extrato libre (30)	10	75

(1) La germinación se efectuó en la solución de sacarosa (10%) y 10 ml. En las fracciones se usó un intervalo en la curva de germinación (21 y 24). El método usado fue el de Nelson, dando como resultado germinaciones totales (100%).

13. Incorporación de ^3H -Leu en embriones de maíz durante la germinación.

Todos los experimentos realizados hasta este punto fueron encaminados para conocer las características del factor inhibitorio y su efecto en la germinación, pero no se había realizado alguno que revelara a nivel molecular su acción sobre la síntesis de proteínas. Un experimento de este tipo fue la observación del efecto del extracto de papa sobre la incorporación de un aminoácido radiactivo (^3H -Leu) a la síntesis de proteínas durante la germinación de embriones de semillas de maíz.

Se siguió el método descrito por Sánchez de Jiménez y Aguilar (40), modificando algunos puntos:

Se montó un sistema que contenía 10 embriones, amortiguador de imbibición (Tris-HCl 50 mM, pH=7.6, KCl 50 mM, MgCl_2 10 mM, -sacarosa 2%) y concentraciones variables de extracto inhibitorio obtenido del extracto crudo de papa (del t_0), previamente tratado con PMSF 5 mM pasado por una columna de sephadex G-25, para quitar el PMSF libre y precipitado con sulfato de amonio (obteniendo la fracción 30-60% de sulfato de amonio). El sistema con los embriones se incubó por 12 horas a 25 °C, posteriormente se le agregó ^3H -Leu (0.5 μCi /embrión) en amortiguador de imbibición y se incubó por 12 horas más. En las mismas condiciones se preparó el control pero sin agregar el factor inhibitorio.

Los resultados se muestran en la tabla 14 en donde se observa que a una concentración de 0.7 mg/ml de proteína de la fracción ensayada, hay un 97.2% de inhibición de la incorporación de cuentas, la cual se reduce al 52% en el caso de tener 0.0076 mg/ml de proteína, es decir en una dilución de mil veces.

Este experimento muestra claramente que la fracción inhibitoria del extracto de papa afecta la síntesis de proteínas en la germinación de maíz.

Tabla 14. Incorporación de leucina ³H in vivo por un sistema de embriones de maíz (Zea mays), en presencia de la fracción inhibitoria de tejido fresco de Solanum tuberosum L.

Concentración de proteína en mg/ml. de los extractos de papa tratados. (1)	% de Incorporación de leucina ³ H.	% de inhibición de incorporación.
0.70	2.70	97.20
0.076	10.11	89.89
0.0076	48.00	52.00
----- (2)	100.00	-----

Se procedió a agregar desde el principio de la incubación la fracción inhibitoria en concentraciones variables. Se incubó por 24 horas a 26°C.

(1) La fracción inhibitoria que se usó en esta determinación se obtuvo de un extracto crudo de tejido fresco de papa al cual se le agregó PMSF 5 mM, posteriormente se pasó por una columna de sephadex G-25 y finalmente se fraccionó con sulfato de amonio, se usó la fracción 30-60% de la sal. La determinación de proteína se realizó después de los tratamientos descritos usándose el método de diferencia de absorbancias a 260 y 280 nm (33).

(2) El control consistía en el mismo sistema de incorporación pero sin el factor inhibitorio de papa.

Se probó posteriormente si la actividad inhibitoria - del extracto (fracción 30-60% de sulfato de amonio) sobre la germinación, persistía aún después de retirarlo de las - semillas, lavándolas con agua, después de haber sido incu- badas en presencia del factor presente en el extracto. Pa- ra esto las semillas fueron lavadas a las 24 horas de incu- bación en presencia del extracto y se incubaron posterior- mente solo con amortiguador de extracción.

Los resultados se muestran en la tabla 15, donde se-- observa que parte de la actividad inhibitoria se conserva- aún después del lavado, hasta en un 60% en todas las dilu- ciones del extracto. La cantidad que penetró a las semillas no fué suficiente para mantener la inhibición de la germina- ción en los niveles anteriormente obtenidos.

Finalmente se probó la actividad del extracto crudo (t_0) almacenado por 30 días a -20°C . Los resultados se muestran en la tabla 16 donde se observa que persiste la actividad - inhibitoria de la germinación en un 50%. Por lo que puede - decirse que el factor inhibitorio es bastante estable al al- macenamiento. Esta propiedad de estabilidad puede hacerlo - capaz de cumplir con la función biológica que se cree que - tiene, es decir la de mantener la latencia de los tubérculos de papa por largo tiempo.

Tomando en cuenta todos los resultados obtenidos se puede decir que:

-Existe un factor inhibitorio asociado al tejido fresco de Solanum tuberosum L, papa, que inhibe la germinación- de semillas de maíz (Zea mays), cuya actividad disminuye a- medida que transcurre el tiempo posterior a la herida.

Dicho factor tiene un peso molecular igual o mayor a - 12000 daltones como lo demostraron los experimentos de diál- lisis y de la columna de sephadex-G-25.

-Se demostró que el efecto inhibitorio del extracto de papa no era debido a compuestos del tipo de los fenoles.

Tabla 14. Efecto del lavado de las semillas sobre la actividad de la fracción inhibitoria precipitada con sulfato de amonio de tejido fresco de Solanum tuberosum L. La acción inhibitoria se midió sobre la germinación de maíz.

Concentración de proteína en mg/ml. (1).	Tratamiento del lavado. (2)	% de germinación posterior al lavado, en amortiguador de extracción.
0.76		40
0.076		40
0.0076	(3)	40
-----Control		90

(1) Las mismas condiciones de la determinación que la tabla 16. Se usó la fracción 30-60% de sulfato de amonio.

(2) Se incubó el sistema de semillas en presencia de las diferentes diluciones de la fracción inhibitoria, por 24 horas a 26°C. Posteriormente se lavaron las semillas con agua en forma vigorosa y se incubaron estas semillas en presencia de amortiguador de extracción por 24 horas más.

(3) Control: amortiguador de extracción.

Tabla 15. Efecto del tiempo de almacenamiento del extracto de tejido fresco de Solanum tuberosum L, en su actividad sobre la germinación. (El extracto se almacenó por 30 días a -20°C).

Concentración de proteína en mg/ml. (1)	% de Germinación. (2)
L.28	50
0.64	50
0.24	50
0.128	60
0.0 28	60
Control (3)	90

(1) Determinada por el Método de Lowry (32).

(2) Igual que en la tabla 2.

(3) Control: amortiguador de extracción.

el extracto no contribuye de manera apreciable a la inhibición de la germinación, pues aún desactivadas las proteasas-dependientes de sulfhidrilo con PMSF, persiste la inhibición.

-La inhibición tampoco se debe a la presencia de carbohidratos pues las semillas fueron capaces de germinar hasta en un 75% en extractos en los cuales se habían hidrolizado las proteínas y solo están presentes los carbohidratos.

-El factor inhibitorio no es una RNasa, pues se probó RNasa pura, a la misma actividad que en el extracto de tejido fresco de papa y no exhibió efectos en la germinación. El factor precipita con sulfato de amonio en la fracción entre 30 y 60 % de concentración de la sal. Esta fracción inhibe la germinación entre un 90 y 95%.

-La fracción inhibitoria detiene la incorporación in vivo en embriones de maíz de ^3H -Leu en un 90%.

-Finalmente se mostró que la actividad inhibitoria del extracto de papa persiste al cabo de 30 días de almacenamiento lo que revela la relativa estabilidad del factor.

En cuanto al papel fisiológico del inhibidor asociado al tejido de papa se puede suponer que este puede ser el encargado de mantener el estado de latencia en el tejido. Esto es factible de pensarse pues en la papa al existir una gran cantidad de agua, los ribosomas que puedan estar presentes debían de asociarse al RNA mensajero, sin embargo esto no sucede además de que la síntesis de proteínas es muy baja así como también otras actividades metabólicas. Cuando el tejido se hiere, empieza el despertar metabólico que se caracteriza por el aumento en la síntesis de proteínas, tanto estructurales como catalíticas mientras que el factor inhibitorio pierde su actividad.

Por ahora falta conocer el modo de acción de este inhibidor para mantener la latencia y conocer su forma de síntesis en el tubérculo. Finalmente purificarlo con el fin de conocer más acerca de su propiedades fisicoquímicas. y establecer su acción fisiológica en el tejido, en relación a la latencia y a la respuesta de herida o envejecimiento.

De acuerdo con los resultados ya discutidos se pueden dar las siguientes conclusiones:

- Se cumplieron los objetivos planteados al principio de este trabajo, pues el bioensayo que se usó para probar el factor inhibitorio dió resultados confiables en el sentido de que se puede asegurar que los efectos reportados son directamente causados por los extractos de papa.

- Los resultados se obtuvieron de una manera sencilla, pudiendo con ellos empezar a caracterizar un factor inhibitorio relacionado con la síntesis de proteínas asociado al tejido fresco de papa.

El factor inhibitorio encontrado es de carácter proteico, de alto peso molecular. Su actividad disminuye de forma directa al tiempo posterior a la herida. Dicho factor detiene la síntesis de proteínas de un sistema de germinación, suprimiendo esta casi totalmente. Pudiéndose probar su actividad en un sistema in vivo, lo que corrobora los datos obtenidos por Cocotle(25), del inhibidor en el sistema de traducción in vitro.

Por lo tanto se puede asumir que el inhibidor tiene un papel fisiológico dentro del sistema de latencia-envejecimiento.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Bewley, J.D. and Black, M. Physiology and Biochemistry of seeds. Vol. I. Ed. Springer-Verlag. Berlin. 306pp. (1978).
- 2.- Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. The Germination of seeds. Ed. Pergamon Press. Oxford. 192pp. (1975).
- 3.- Simon, E.W. and Raji, Harun, R.M. Leakage during seed imbibition. *J. Exp. Bot.* 23 7, 1076-85. (1972).
- 4.- Marbach, I. and Mayer A. Permeability of seeds - coat to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. *Plant Physiol.* 54. 817-20. (1974).
- 5.- Mayer, A.M. and Shain, Y. Control of seed germination. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25. 167-93. (1974)/
- 6.- Mayer, A. and Evenari, M. Influence of coumarin and 2,4D on germination in conjunction with thiourea and cysteine. *Bull. Research Council Israel* 1. 125-9. (1951).
- 7.- Kahl, G. Biochemistry of wounded plant tissue. Ed. Walter de Gruyter. Berlin. 1-30. (1978).
- 8.- Kahl, G. Activation of protein synthesis in -- aging potato tuber slices. *Z. Naturforsch.* 26 b. 1064-67. (1971).
- 9.- Stark, G.R. Enzymes function and regulation. - Ed. McGraw Hill. USA. 14-21. (1978).
- 10.- Stadtman, E. Mechanisms of enzyme regulation - in metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* 37. 197-459. (1968).
- 11.- Sacher, J.A., Tseng, J., Williams, R. and Cabello, A. Wound-induced RNase activity in sweet potato. *Plant Physiol.* 69. 1060-65. (1982).

- 12.- Pitt, D. Increase in ribonuclease activity -- following mechanical damage to leaf and tuber tissues of Solanum tuberosum L. Planta. 101. 317-32. (1971).
- 13.- Tanaka, Y. and Matsushita, K. Some investigation on inactivation of phenylalanine -- ammonia lyase in cut injured sweet potato-root tissue. Plant Cell Physiol. .89. -- 1209-16. (1977).
- 14.- Asahi, T. and Majima, R. Effect of antibiotics on biogenesis of mitochondria during aging of sliced sweet potato tissue. Plant Cell Physiol. . 10. 317-23. (1969).
- 15.- Apress, T. and Beevers, H. Pentose phosphate pathways a major component of induced respiration of carrot and potato slices. Plant Physiol. 35. 839-47. (1960).
- 16.- Minamikawa, T. and Uritani, I. Phenylalanine deaminase and tyrosine deaminase in sliced of black-rot infected sweet potato roots. Arch. Biochem. Biophys. 108. 573-4. (1964).
- 17.- Zucker, M. Sequential induction of phenyl -- alanine ammonia lyase and a lyase-inactivation system in potato tuber disks. Plant Physiol. . 43. 365-74. (1968).
- 18.- Kahl, G. Metabolism in plant storage tissue slices. Bot. Rev. 40. 263-314. (1974).
- 19.- Stumpf, P. and Conn, E. Plant Proteinases. The Biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Vol. 6. 322-46. (1978).
- 20.- Pérez, B.C.A. Poliaminas y actividad proteolítica en tejido herido de Solanum tuberosum L. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. - UNAM. (1983).

- 21.- Van Steveninck, R.F.M. Control of ion transport in plant storage tissue slices. Biochemistry of wounded plant tissues. Ed. Walter de Gruyter. Berlin. 500-40. (1978).
- 22.- Thimann, K.V. Senescence in plants. Ed. CRC-press. Vol. I. 1-2. (1978).
- 23.- Van Steveninck, R.F.M. The "washing or "aging" phenomenon in plant tissues. Ann. Rev. Plant Physiol. 26. 237-58. (1975).
- 24.- Ryan, J. Diffusion factors in wounded phenomenon in plant tissues. Biochim. Biophys. Acta. -- 249. 177-80. (1974).
- 25.- Cocotle, R.Y. Actividad diferencial de síntesis de proteínas durante la respuesta a herida en Solanum tuberosum L. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. (1984).
- 26.- Román, P.R. y Cocotle, R.Y. Suppl. Plant Physiol. Mayo, 1984.
- 27.- Ap Rees, T. and Bryant, J.A. Effects of cycloheximide on protein synthesis and respiration in disks of carrot storage tissue. Phytochem. 10. -- 1183-90. (1971).
- 28.- Click, R.E. and Hackett, D.P. The role of protein and nucleic acid synthesis in the development of respiration in potato tuber slices. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 50. 243-50. (1963).
- 29.- Laties, G.G. Inhibition of RNA and protein synthesis by chloral in potato slices. Plant Physiol. 40. 1237-41. (1965).
- 30.- Ellis, R.J. and Mac Donald, I.R. Activation of protein synthesis by microsomes from aging beet disks. Plant Physiol. 42. 1297-1302. (1967).
- 31.- Chapman, J.M. and Edelman, J. Relationship between protein synthesis in tuber disks and protein synthetic activity of a cell free preparation.

Plant Physiol. 42.1140-46. (1967).

32.- Lowry, O. and Rosebrough, N. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193. 265-75. (1951).

33.- Layne, E. Spectrophotometric and turbidimetric Methods for measuring proteins. Meth. in Enzymol. Vol. III. 447-466. (1957).

34.- Soloway, S. and Wilen, S.H. Improved ferric chloride test for phenols. Analytical Chem. 24. [6]. 979-83. (1952).

35.- Feller .Patterns of proteolytic enzyme activities in different tissues of germinating corn (Zea mays) Planta. 140.155-62. (1978).

36.- Rosen, H. A modified ninhidrin colorimetric analysis for aminoacids. Arch. Biochem. Biophys. 67. 10-15. (1957).

37.- Crestfield, A.M., Stein, W.H. and Moore, S. The preparation of bovine pancreatic ribonuclease A. J. Biol. Chem. 238. 618-29. (1963).

38.- Nelson, N. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153. 375-80. (1944).

39.- Cooper, G. The tools of Biochemistry. Ed. John Wiley and Sons. New York. 370-74pp. (1977).

40.- Sánchez de Jiménez E. and Aguilar R. Protein synthesis patterns. Plant Physiol 75. 231-34. (1984).