

24  
33



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**Niveles y Distribución de Calcio en el  
Endospermo de la Semilla de Trigo**



EXAMEN PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
HILDA FLORES BRITO

MEXICO, D. F.

1989

**FALLA DE ORIGEN**



## **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.

## INDICE GENERAL

Indice de tablas  
 Indice de figuras  
 Resumen

	Pag
CAPITULO I	
Introducción y Antecedentes	1
1.1. Estructura de la semilla de trigo.	4
1.2. Reservas alimenticias de la semilla de trigo. Su ubicación celular y tisular.	8
1.3. La germinación y su relación con los fitorreguladores.	13
1.4. La movilización de reservas y su regulación.	21
1.4.1. Movilización de carbohidratos. Papel de la $\alpha$ -amilasa.	25
1.4.1.1. Inducción de $\alpha$ -amilasa.	27
1.4.1.2. Isoenzimas de $\alpha$ -amilasa.	31
1.4.1.3. Secreción de $\alpha$ -amilasa.	32
1.4.2. Movilización de minerales.	34
1.5. Papel del calcio en la inducción de la $\alpha$ -amilasa.	36
1.5.1. Calcio en la secreción de $\alpha$ -amilasa.	36
1.5.2. Calcio en la síntesis de $\alpha$ -amilasa.	41
CAPITULO II. OBJETIVOS	45
CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS	47
III.1. Reactivos y material.	47
III.2. Obtención del material biológico.	47
III.2.1. Imbibición de medias semillas.	48
III.2.2. Aislamiento de capas de aleurona y endospermos almidonosos.	49
III.2.3. Incubación de capas de aleurona con ácido giberélico ( $GA_3$ ).	49

III-2.4. Tratamiento de las capas de aleurona con EGTA y H <sub>2</sub> O.	51
III-3. Métodos analíticos.	53
III-3.1. Determinación de la actividad de $\alpha$ -amilasa.	53
III-3.2. Extracción de calcio soluble.	54
III-3.3. Preparación de muestras para medir calcio total.	55
III-3.4. Determinación de calcio por espectroscopia de absorción atómica.	56
III-3.5. Determinación del peso seco de diferentes tejidos de la media semilla.	56
CAPITULO IV RESULTADOS	57
IV.1. Niveles de calcio total y su distribución en los tejidos de la media semilla de trigo.	57
IV.2. Efecto de la esterilización superficial e imbibición sobre la distribución de calcio de la media semilla.	59
IV.3. Origen del calcio en la inducción de $\alpha$ -amilasa por capas de aleurona.	59
IV.4. Efecto de la eliminación del calcio de la capa de aleurona sobre la inducción de $\alpha$ -amilasa.	64
CAPITULO V DISCUSION.	67
CAPITULO VI CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	72
CAPITULO VII. BIBLIOGRAFIA.	74

INDICE DE TABLAS

	Pag
1.1 Composición de las reservas nutritivas de varias semillas.	9
1.2 Composición en aminoácidos de las proteínas del endospermo almidonoso y gránulos de aleurona.	11
IV.1 Niveles de calcio total en los tejidos de la de la media semilla de trigo.	58
IV.2 Efecto de la esterilización superficial e imbibición sobre la distribución del calcio de la media semilla de trigo.	60
IV.3 Efecto de la eliminación del calcio de la capa de aleurona sobre la inducción de $\alpha$ -amilasa.	66

INDICE DE FIGURAS

	Pag
I.1 Estructura de la semilla de trigo.	5
I.2 Reacción catalizada por la fitasa.	14
I.3 Estructuras químicas de algunas fitohormonas.	16
I.4 Estructuras de giberelinas comunmente encontradas en semillas.	18
I.5 Etapas de la movilización de reservas.	22
I.6 Relación entre la producción de ácido giberélico y la formación de enzimas hidrolíticas con la producción de solutos en el endospermo almidonoso.	24
I.7 Cinética de inducción de $\alpha$ -amilasa en cebada y trigo.	28
I.8 Mecanismo hipotético de la biosíntesis y transporte intracelular de $\alpha$ -amilasa en escutelo de arroz.	33
I.9 Efecto de la temperatura y osmolitos sobre la secreción de $\alpha$ -amilasa.	36
I.10 Efecto del cambio en la concentración de calcio del medio sobre la secreción de $\alpha$ -amilasa	39
I.11 Efecto de EGTA sobre la producción de $\alpha$ -amilasa.	40
I.12 Efecto de la adición de calcio al medio de incubación de capas de aleurona sobre la secreción de las isoenzimas de $\alpha$ -amilasa .	42
III.1 Obtención de capas de aleurona y endospermos almidonosos	50
III.2 Incubación de capas de aleurona con $GA_3$ y preparación de los extractos para la determinación de $\alpha$ -amilasa.	52
IV.1 Origen del calcio en la inducción de $\alpha$ -amilasa empleando capas de aleurona de trigo.	63

## RESUMEN

La síntesis y secreción de  $\alpha$ -amilasa por capas de aleurona de cebada y por protoplastos de cebada depende de la participación de una giberelina ( $GA_3$ ) y de calcio en el medio de incubación, en concentraciones milimolares (0.5mM a 20mM). Tal circunstancia parece sugerir, que alguno de los tejidos externos a la célula de aleurona debe constituir la fuente del calcio que se emplea en la inducción de la  $\alpha$ -amilasa.

Los valores de calcio total encontrados en este trabajo para los tejidos de la media semilla de trigo (capa de aleurona y endospermo almidonoso), establecen que la mayor proporción del calcio total, se encuentra en la capa de aleurona, situación que convierte a éste tejido en la reserva más importante de este catión, y por lo tanto, en la fuente más probable para aportar el calcio requerido en la inducción de la  $\alpha$ -amilasa.

Aunque en cebada el calcio de la capa de aleurona no parece ser suficiente para la inducción de la enzima, ya que se requiere de una afluencia externa del catión, para observar la completa secreción de la enzima, en trigo según resultados obtenidos en este trabajo, esto no es necesario, indicando que la inducción de  $\alpha$ -amilasa puede llevarse a cabo únicamente con el calcio de la capa de aleurona. Los resultados indican que aunque el endospermo almidonoso contiene el 33% del calcio total de la media semilla, éste no parece participar en la inducción de la enzima.

También se determinó que en los procesos de imbibición y esterilización de las medias semillas, se pierde alrededor de 20% del calcio total, el cual parece no intervenir en la inducción de la enzima, pues a pesar de esta pérdida, el calcio de la capa de aleurona fué suficiente para sostener una inducción con  $GA_3$ .

## CAPITULO I. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Después que una semilla logra romper los obstáculos que la mantenían en estado de latencia y consigue germinar, la posibilidad de que se establezca una nueva generación, depende en gran medida de que ocurra la serie de procesos bioquímicos y fisiológicos conocidos como *mobilización de reservas*, con lo que la plántula adquiere la capacidad para establecerse como organismo autotrófico (Bewley y Black, 1983). En el caso de los cereales, la presencia en el endospermo almidonoso de varias enzimas, secretadas por la capa de aleurona, como  $\alpha$ -amilasa, proteasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa, fosfatasa y ribonucleasa, constituye un aspecto indicativo de que la *mobilización de reservas* se ha iniciado. Los productos de actividad de estas enzimas (azúcares, aminoácidos, minerales, etc.) son asimilados por el embrión, en etapas posteriores del proceso, favoreciéndose así el sostenimiento de las primeras etapas de la germinación (Jones y Armstrong, 1971).

En el caso particular de la  $\alpha$ -amilasa, el inicio de su actividad es producto de una inducción, donde la transcripción del gen y su posterior traducción parecen estar mediados por una giberelina ( $GA_3$ ) (Higgins y col., 1976 y Bernal, 1978).

Además de la giberelina, la inducción de  $\alpha$ -amilasa requiere la participación del ion calcio en las etapas de síntesis y secreción de la proteína (Jones y Carbonell, 1984).

No obstante que la célula de aleurona contiene reservas intracelulares de calcio en varios de sus organelos, tales como mitocondrias, retículo endoplásmico, vacuolas y cuerpos protelcos, se ha evidenciado desde varios enfoques experimentales que estas reservas no parecen participar en la inducción de  $\alpha$ -amilasa, ya que al reproducir el proceso *in vitro* y adicionar ácido giberélico ( $GA_3$ ) a capas de aleurona ó a protoplastos aislados de células de aleurona de cebada, siempre es necesario adicionar calcio al medio de incubación.

En relación a esto último, Jones y Carbonell (1984) encuentran que el calcio tiene efectos cualitativos y cuantitativos en la regulación de la síntesis de  $\alpha$ -amilasa, ya que los niveles de la enzima obtenidos con capas de aleurona de cebada incubadas solo con  $GA_3$ , se incrementan en 8 a 9 veces al adicionar al medio 10mM de  $Ca^{2+}$ . Este aumento en la actividad enzimática responde a un incremento en la síntesis de las isoenzimas de pl alto, las que requieren además de  $GA_3$  en el medio de incubación, la adición de 0.5mM de  $Ca^{2+}$  para iniciar su síntesis.

Por su parte, Bush y col (1986) usando como modelo experimental protoplastos de células de aleurona de cebada, en el estudio del efecto de calcio en la síntesis y secreción de  $\alpha$ -amilasa, encuentran resultados semejantes cualitativamente a los de Jones y Carbonell (1984), los que parecen indicar que estas células tienen un mecanismo de síntesis y secreción para  $\alpha$ -amilasa que depende de la concentración de calcio en el medio externo.

Bush y Jones (1988) concluyen al estudiar el efecto de calcio externo sobre los niveles de calcio citoplásmico y su relación con la secreción de  $\alpha$ -amilasa en protoplastos de aleurona de cebada, que la secreción de la enzima varía en función de los niveles de calcio interno, los cuales cambian en respuesta a la concentración del calcio externo y del pH. Los autores encuentran que si el medio de incubación contiene 20 mM de calcio, la concentración de calcio citoplásmico se eleva de 200nM a 350nM con el consecuente incremento en la liberación de la enzima.

Tales evidencias indican que las células de aleurona deben proveerse de este ión a partir de algún reservorio externo a ellas, como pudiera ser: la pared celular de la aleurona o el endospermo almidonoso.

Se ha reportado en cebada, que la capa de aleurona, es la que contiene la mayor proporción del calcio de la media semilla

(Stewart y col., 1988), no obstante esto, el ion debe adicionarse exogenamente al medio que contiene capas de aleurona y acido giberélico, lo que sugiere una participación adicional al calcio presente en otros tejidos, posiblemente el contenido en el endospermo almidonoso.

Se ha encontrado mediante microscopia de fluorescencia (Tretyn y Kopcewicz, 1988), que buena parte del calcio de la capa de aleurona de avena parece estar localizado en la membrana plasmática y en las paredes celulares que rodean a las células. Tales resultados sugieren, que el calcio necesario para la inducción de  $\alpha$ -amilasa, pudiera ser proporcionado por estos depósitos.

En la semilla de trigo también se ha puesto de manifiesto que la inducción de  $\alpha$ -amilasa, requiere calcio (Rodríguez, 1989) pues cuando las capas de aleurona obtenidas de este cereal, se incuban a un pH de 4.0, en presencia de  $GA_3$  pero en ausencia de calcio adicionado exogenamente, la actividad enzimática obtenida con el calcio presente inherentemente en el tejido, disminuye gradualmente si la incubación se hace en presencia de un quelante específico del ion (EGTA), logrando restaurar el nivel inicial de actividad enzimática si se elimina éste último y se incuba el tejido con 20mM de calcio. Tal resultado sugiere que el calcio presente en la capa de aleurona de trigo participa en la inducción de  $\alpha$ -amilasa.

Las evidencias presentadas, sugieren la necesidad de analizar la distribución de calcio en los tejidos que constituyen a la media semilla de trigo, especialmente en lo que respecta al calcio presente en la capa de aleurona, ya que éste componente de la semilla, constituye el modelo experimental generalmente empleado en el estudio del efecto del  $GA_3$  en la inducción de hidrolasas tales como  $\alpha$ -amilasa y proteasa, pues a pesar de que la capa de aleurona tiene que ser separada del resto de los tejidos que

conforman a la semilla, las células de aleurona siguen reteniendo la capacidad de responder a la adición exógena de  $GA_3$ , siendo posible por lo tanto reproducir *in vitro* la inducción de enzimas y estudiar un fenómeno de regulación hormonal.

En el caso particular de la inducción de  $\alpha$ -amilasa, no se conoce con precisión en qué paso del proceso participa el calcio, ni cuál es el mecanismo seguido para ejercer su efecto, aunque sí parece claro que los niveles de la enzima dependen del ion, por lo que el objetivo general de este trabajo se centrará en establecer la distribución y nivel de calcio en tejidos de la media semilla de trigo con la perspectiva de analizar su participación como una posible fuente de calcio en la inducción de  $\alpha$ -amilasa.

#### 1.1. ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE TRIGO

El trigo constituye uno de los cereales más extendidos en el mundo. Es una Gimnosperma y pertenece a la familia de las gramíneas. Las estructuras básicas que se reconocen en una semilla de trigo son: a).-La testa, b).-El endospermo, formado a su vez por el endospermo almidonoso y la capa de aleurona y c).-El embrión. Cada una de estas estructuras tienen orígenes genéticos diferentes.

En la figura 1.1 se esquematizan estas estructuras, así como su localización dentro de la semilla de trigo.

La testa, es la estructura que se encuentra envolviendo al endospermo. Constituye una de las barreras físicas que deben vencerse durante la etapa de incorporación de agua (imbibición), la que es de suma importancia para el inicio de la germinación.

La testa es una cubierta dura, de naturaleza cerosa, lo que le imparte la característica de ser impermeable al agua y/o a

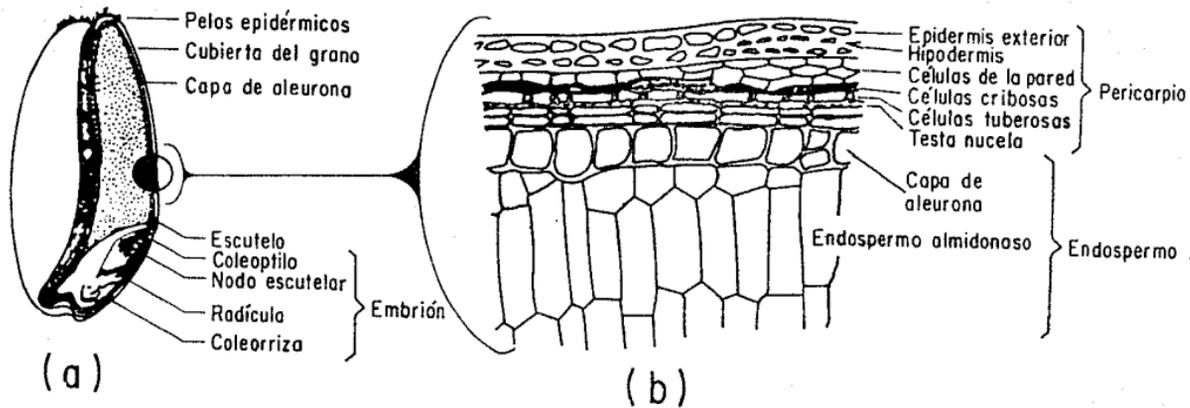


Fig. 1.1 Estructura de la semilla de trigo.

a) Corte longitudinal del grano completo (Bassil, 1977).

b) Corte que muestra las partes del pericarpio y endospermo (Pab, 1977).

gases, ejerciendo por lo tanto, efectos regulatorios sobre la formación de metabolitos, así como en el crecimiento de los tejidos y órganos de la semilla. Uno de los posibles factores que contribuyen a la impermeabilidad de la testa, es la oxidación de compuestos fenólicos como el ácido ferulico (Mayer y Poljakoff, 1975).

La testa tiene su origen en varios tegumentos del óvulo, cuenta con 42 cromosomas derivados directamente de la célula madre (Flintham y Gale, 1988).

En el caso de los cereales, que son frutos carióspsides, en los que no existe la pulpa del fruto, la testa se encuentra fusionada a la cubierta del fruto (pericarpio) constituyendo ambas estructuras, una unidad.

El *endospermo* es el tejido característico de las Angiospermas. Este se encuentra rodeando al embrión. Es una estructura relativamente grande, en el caso de los cereales constituye el sitio principal de las reservas alimenticias, aunque en otros casos puede no existir, como es el caso de la familia Orchidaceae o como en otros donde el endospermo puede degenerar en la formación de cotiledones como órganos de reserva (frijol). Las reservas nutritivas del endospermo son utilizadas por el embrión, en las etapas posteriores de la germinación.

El *endospermo* es un tejido triploide, ya que es el producto de la fusión de 3 núcleos haploides: dos núcleos polares (42 cromosomas) y un núcleo masculino (21 cromosomas), por lo que cuenta con 63 cromosomas (Flintham y Gale, 1988).

En cereales, el *endospermo* está compuesto por dos tipos de tejido: el endospermo almidonoso y la capa de aleurona (fig. I.1.b). El primero está formado por células muertas, las que contienen las reservas nutritivas de la semilla, que en el caso de los cereales, están constituidas principalmente por almidón y una fracción menor de proteínas y minerales.

Respecto a la capa de aleurona, esta se encuentra recubriendo al endospermo almidonoso. Tiene su origen en las células periféricas de este tejido, puede estar constituida por una o más capas de células. En el caso de trigo la capa de aleurona contiene una sola capa de células.

Estas células tienen la característica de no poder dividirse, lo que les confiere uniformidad en su ciclo celular. Alcanzan su diferenciación final, al interaccionar con el  $GA_3$ , sintetizando y secretando varias enzimas hidrolíticas hacia el endospermo almidonoso, las que juegan un papel muy importante durante la germinación, ya que su actividad permite que las proteínas, carbohidratos y minerales presentes en el endospermo almidonoso sean hidrolizados a metabolitos más fácilmente asimilables por el embrión en crecimiento.

Dentro de las características citológicas de estas células, es importante mencionar que poseen una gruesa pared celular, así como inclusiones celulares denominadas *cuerpos proteicos* o *gránulos de aleurona*, los que constituyen los depósitos de proteínas y minerales.

Con respecto al embrión, éste es el producto del cigoto el que siguiendo un patrón orientado de divisiones celulares, da lugar a que éste adopte una forma específica, en la que es posible reconocer: un eje embrionario con un cotiledón rudimentario (epicótilo). En la base del eje se encuentra la radícula, cubierta por la coleoriza, mientras que en la parte superior del mismo se halla el coleótilo, el cual protege al tallo (plumula o epicótilo).

Las células del embrión poseen el complemento normal de 42 cromosomas: 21 cromosomas derivados de la célula madre y 21 cromosomas provenientes del polen.

## 1.2 RESERVAS ALIMENTICIAS DE LA SEMILLA DE TRIGO. SU UBICACION CELULAR Y TISULAR.

Las reservas alimenticias de una semilla, están constituidas por grandes cantidades de carbohidratos (cereales) ó lípidos, (oleaginosas), una pequeña proporción de proteína y una cantidad aún menor de compuestos inorgánicos. Estos componentes de la semilla, apoyan el crecimiento y/o desarrollo de la plántula en las primeras etapas de la germinación.

Aunque la composición química de estas reservas esta determinada genéticamente, puede modificarse por factores del medio ambiente tales como composición química del suelo, clima, o por factores de otro tipo, como es la obtención de variedades mejoradas seleccionadas a través de cruza.

Estas reservas se localizan como inclusiones intracelulares, en forma de a) *corpos proteicos* (depósitos de proteínas y minerales), b) *esferosomas* (acumulos de lípidos), c) *amiloplastos* (gránulos de almidón).

Estas inclusiones se pueden encontrar en mayor o menor proporción en los dos tipos de tejidos que forman el endospermo (endospermo almidonoso y capa de aleurona).

En el caso de trigo, el endospermo constituye el sitio de almacenamiento de estas reservas, aunque también se encuentran en el embrión y en menor proporción a lo largo de todo el grano.

En la tabla I.1 se muestra la composición química de varias semillas. En ella podemos ver que el almidón constituye el nutrimento mayoritario de los cereales como trigo (75%), aunque también contienen proteínas (12.0%) y lípidos (4.0%).

Respecto a los *carbohidratos*, específicamente el almidón que es el más abundante, se almacena en los *amiloplastos*. Estas estructuras se observan dentro de las células del endospermo almidonoso, pero no dentro de las células de aleurona.

TABLA I.1 COMPOSICIÓN DE LAS RESERVAS NUTRITIVAS DE VARIAS SEMILLAS  
(BEWLEY Y BLACK, 1983).

ESPECIES	COMPOSICIÓN PORCENTUAL (PESO SECO)		PRINCIPAL ÓRGANO DE RESERVA	
	PROTEÍNA	GRASA	COMPONENTE DEL ELN.	PRINCIPAL
Maíz ( <i>Zea Mays</i> )	11	5	75 (almidón)	Endospermo
Avena ( <i>Avena sativa</i> )	13	8	66 (almidón)	Endospermo
Trigo ( <i>T. aestivum</i> )	12	2	75 (almidón)	Endospermo
Centeno ( <i>Secale cereale</i> )	12	2	76 (almidón)	Endospermo
Cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> )	12	3	76 (almidón)	Endospermo
Soya ( <i>Glycine max</i> )	37	17	26 (almidón)	Cotiledón
Nabo ( <i>Brassica napus</i> )	21	48	19 (almidón)	Cotiledón
Palma ( <i>Elaeis guineensis</i> )	9	49	28	Endospermo
Pino ( <i>pinus pinea</i> )	35	48	6	Megatófito

ELN (Extracto libre de Nitrógeno consiste básicamente de almidón, azúcares libres y dextrinas.)

Es posible identificar dos tipos de amiloplastos, lenticulares y esféricos, con un largo que va de 2 a 3 $\mu$ . Ambos tipos pueden contener tanto amilasa como amilopectina solo uno de los tipos de almidón. La presencia en la semilla de otros polisacáridos, adicionales al almidón, tales como hemicelulosas y galactomananas, son irrelevantes cuantitativamente, aunque algunos oligosacáridos son vitales para el embrión, ya que son parte de la reservas con que se inicia la germinación.

Los carbohidratos que se encuentran en la célula de aleurona son principalmente sacarosa, rafinosa y fructosa, los que junto con otros metabolitos, permiten la rápida proliferación del sistema intracelular de membrana y el de síntesis de proteínas, los que proporcionan las proteínas que servirán como materia prima en la síntesis de las enzimas hidrolíticas inducidas por el GA<sub>3</sub>.

Las proteínas constituyen un segundo componente de las reservas de los cereales.

Se sabe poco respecto a las proteínas de las células de aleurona, aunque su composición parece ser muy diferente a las proteínas del endospermo almidonoso (Tabla I.2). En ambos casos, las proteínas parecen ser sintetizadas por polirribosomas unidos a retículo endoplásmico, acumulándose en los cuerpos proteicos (Fincher, 1989).

Las proteínas del endospermo almidonoso están constituidas básicamente por péptidos sin actividad metabólica. Se han clasificado en base a su solubilidad en varios solventes, en 4 grupos como: *glutelinas* (solubles en alcali ó ácido), *prolaminas* (solubles en alcohol acuoso), *globulinas* (solubles en soluciones salinas) y *albúminas* (solubles en agua). predominando en trigo, las prolaminas y glutelinas, ya que juntas representan un 80% de la proteína de reserva, mientras que las restantes contribuyen con un 15%. Dentro del grupo de las albúminas y globulinas, se encuentran enzimas como  $\beta$ -amilasa y proteasa e inhibidores de proteasas (Fincher, 1989).

TABLA 1. COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS PROTEINAS DEL ENDOSPERMO ALMIDONAL Y GRANOS DE ALBUENA DE TRIGO VAR MONITOVA (BEWLEY Y BLACK, 1983)

AMINOACIDO	CELULA DE ALBUENA GRANOS DE AMINOACIDO/10g DE B TOTAL	PROTEINA DE ENDOSPERMO
Asp.	7.30	3.04
Thr	2.80	2.45
Ser	4.00	4.8
Glu	14.30	35.78
Pro	3.55	13.41
Ala	4.68	3.15
Val	4.95	3.88
Met	1.36	1.70
Ile	2.84	3.74
Leu	5.46	6.89
Tyr	2.69	3.52
Phe	3.68	5.47
Lys	9.17	1.50
His	3.69	2.13
Arg	10.49	3.18
1/2 Lys	3.29	0.00
Total	83.63	94.64

Las prolaminas mejor estudiadas son las que se encuentran en las gliadinas del trigo, que por su bajo contenido en aminoácidos esenciales son consideradas como de baja calidad nutricional.

A través del análisis de secuencias y de estudios inmunológicos se ha puesto de manifiesto que dentro de un cereal particular las prolaminas constituyen mezclas polimórficas, que pueden clasificarse en varios grupos, cada uno conteniendo un grupo homólogo de proteínas estructuralmente relacionadas, las que derivan de familias de alrededor de 30 genes (Heidecker y Messing, 1986).

En cuanto al tamaño, los cuerpos proteicos del endospermo almidonoso son diferentes a los que se encuentran en el embrión.

La comparación de la composición en los aminoácidos de las proteínas del endospermo almidonoso, con los de las proteínas de la capa de aleurona (Tabla 1.2.) sugiere una distribución muy diferente de las proteínas que conforman ambos tejidos.

Los minerales constituyen otro elemento importante para el desarrollo de la semilla. En los cereales estos se almacenan en la forma de sales de calcio, magnesio y potasio del ácido fitico (hexafosfato de mio-inositol), complejo conocido como fitina, el que se encuentra inmerso en la matriz de proteína de la célula de aleurona en forma de inclusiones conocidas como *globoides*. Estas inclusiones de minerales están prácticamente ausentes de las células del endospermo almidonoso (Bewley y Black, 1983).

El contenido de fitina y la composición de la misma, varía con la especie y variedad de la semilla, pues mientras que la fitina de trigo contiene 1.5% de magnesio y 12% de calcio, la fitina de avena contiene 15% de magnesio, 8.3% de calcio y 5.7% de potasio (Ashton y Williams, 1958).

A la fitina se le ha adjudicado ser una fuente de fósforo,

pero también representa una reserva potencial de calcio, magnesio y potasio, los que se liberarían al medio paralelamente con el fósforo, vía la actividad de la fitasa (Fig. 1.3).

### 1.3 LA GERMINACIÓN Y SU RELACION CON LOS FITORREGULADORES.

Al finalizar la maduración de la semilla, esta adquiere un estado de latencia caracterizado entre otros aspectos, por un bajo contenido de agua y una tasa metabólica disminuida, debida por un lado, a la inactivación de enzimas así como a una disminución generalizada en la síntesis de proteínas. No obstante tal situación, esta puede revertirse, si la semilla se coloca nuevamente en condiciones adecuadas de agua, luz, temperatura y tensión de oxígeno, con lo que ocurren una serie de eventos bioquímicos y fisiológicos, que finalmente inducen en el embrión cambios morfológicos caracterizados por la emergencia de la radícula, fenómeno al que se ha llamado convencionalmente germinación.

Aunque el fin de la latencia requiere de la participación de los factores medio ambientales ya mencionados (agua, luz, etc.), el inicio de la germinación, se realiza a expensas de las reservas nutritivas de la semilla formadas durante el llenado del grano cuya utilización es el producto de la acción concertada de compuestos conocidos genéricamente como reguladores de crecimiento o fitohormonas.

Sus efectos pueden darse a varios niveles, ya que éstas pueden acumularse con el fin de prepararse para una subsecuente participación en el control de la germinación y crecimiento temprano de la plántula, o pueden participar también en el crecimiento del fruto y su desarrollo, así como en el movimiento de materia seca dentro de la semilla y adicionalmente en el crecimiento y desarrollo de la semilla.

Estos eventos parecen estar controlados por un balance muy fino de las hormonas, donde este balance es más importante que las cantidades absolutas de una hormona en particular.

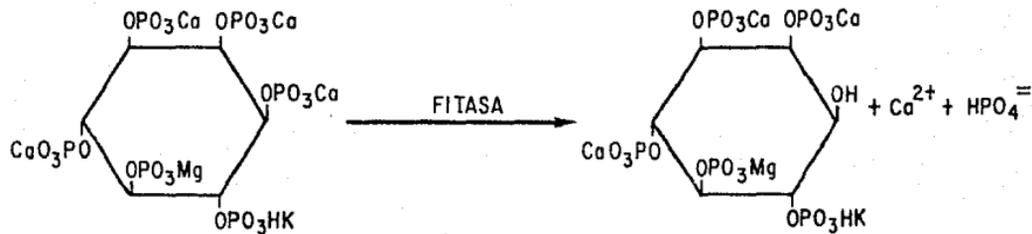


Fig.I.2. Reacción catalizada por la fitasa

Las fitohormonas se pueden clasificar en 5 grupos que son:

- |                  |                     |
|------------------|---------------------|
| a). giberelinas  | d). etileno         |
| b). citoquininas | e). ácido abscísico |
| c). auxinas      |                     |

Las estructuras de las principales fitohormonas pueden observarse en la figura 1.3. (Mayer y Poljakoff, 1975).

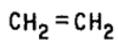
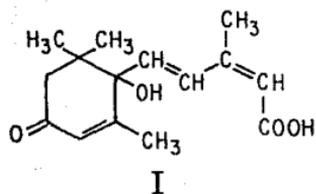
A) **GIBERELINAS:** Estas hormonas son consideradas químicamente como ácidos diterpenoides derivados del ent-kaur-16-eno. Están relacionadas con el ácido giberélico ( $GA_3$ ) ya que comparten el anillo de gibano. La mayoría de ellas tienen 20 carbonos. Su modo de acción y los efectos metabólicos que producen son de interés, pues conducen al fin de la latencia. (figura 1.4)

Se han aislado alrededor de 50 giberelinas tanto de plantas superiores como de semillas, aunque la mayoría se han obtenido de semillas. De las giberelinas aisladas, solo algunas tienen actividad biológica ( $GA_1$ ,  $GA_3$ ,  $GA_4$ ,  $GA_7$ ,  $GA_9$ ,  $GA_{21}$ ,  $GA_{22}$ ) (Khan, 1982 y Macmillan y Takahashi, 1968).

Mientras que en las plantas producen alargamiento del tallo, en las semillas causan la disolución del contenido del endospermo almidonoso, vía la actividad de varias hidrolasas.

Durante la maduración del grano, las giberelinas se almacenan en forma de glucósidos, debiendo hidrolizarse durante el inicio de la germinación (Lang, 1970).

Su sitio de síntesis parece controvertido, pues aunque el modelo más aceptado sobre el proceso donde ellas participan, sugiere que éstas pueden formarse en el embrión de la semilla en germinación (Yomo y Varner, 1971 y Radley, 1967) y de ahí difundir a las células de la capa de aleurona donde ejercen la inducción de hidrolasas, existen evidencias de que la comunicación hormonal en el grano en germinación es mucho más complicada que la inicialmente sugerida por este modelo, ya que la capa de aleurona



II

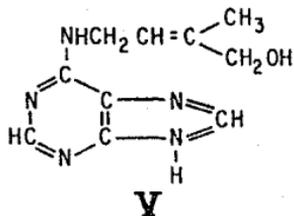
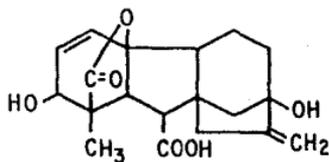
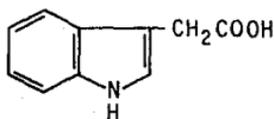


Fig. I.3 Estructuras químicas de algunas fitohormonas (Mayer y Poljakoff, 1975).

I. Acido abscísico (ABA).

II Etileno

III. Acido Indolacético.

IV. Acido giberélico.

V. Zeatina (citocinina).

no parece ser el único sitio de producción de hidrolasas. Pues también el epitelio escutelar produce un cierto nivel de  $\alpha$ -amilasa y  $\beta$ -glucanasa (Gibbons, 1981 (citado en Baulcombe y col., 1984) y Radley, 1967).

Adicionalmente Trewavas (1982), señala que el nivel de  $GA_3$  producido por el embrión es inadecuado para explicar la curva dosis-respuesta de  $GA_3$ - $\alpha$ -amilasa, ya que la concentración de la hormona necesaria para la producción de  $\alpha$ -amilasa, varía en cuando menos 4 órdenes de magnitud, respecto al contenido determinado en el embrión, por lo que el autor propone, que la fuente de giberelinas activas radica, en la reserva de giberelinas conjugadas del endospermo.

Atzern y Weiler (1983), utilizando anticuerpos específicos, en fracciones separadas cromatográficamente de varias regiones del grano de cebada, encuentran que la giberelina  $GA_4$ , es la única cuya producción sigue un patrón paralelo con la producción de  $\alpha$ -amilasa. Además cuando se aplica a medias semillas desembrionadas, estimula la síntesis de  $\alpha$ -amilasa, a pesar de la presencia de inhibidores de la síntesis de giberelinas, por lo que los autores establecen que debe existir otro factor proveniente del embrión, diferente a  $GA_3$ , el que sea el causante de la síntesis de hidrolasas, posiblemente  $GA_1$ , (la cual se observó causaba un incremento en el nivel de  $GA_4$ ) o tal vez alguna molécula que inactive al ácido abscísico.

**B) CITOCININAS:** Estas fitohormonas son derivadas de la adenina. La zeatina del maíz, pertenece a este grupo.

No están claros ni su lugar de síntesis, ni su sitio de acción, como tampoco su mecanismo, aunque parecen tener efecto sobre el metabolismo de RNA (Hall y col. 1967).

Se han involucrado con procesos mitóticos citocinéticos. Su unión con calcio, aumenta sinérgicamente la producción de etileno (Lau y Yang, 1975)

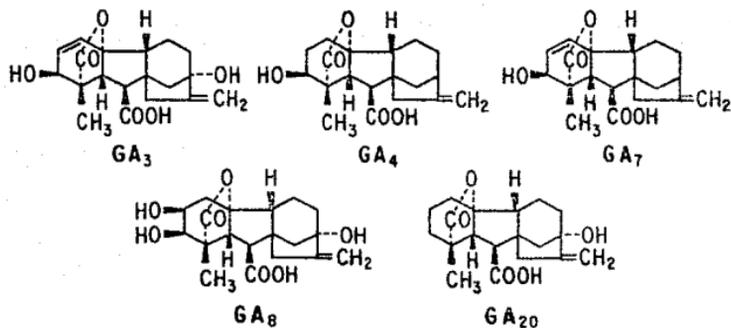


Fig. I. 4. Estructuras de 5 giberelinas comunmente encontradas en semillas (Bewley, 1983)

No se sabe si su acción es un efecto primario o el resultado de otros eventos metabólicos. En el caso de la zeatina, esta parece acumularse en el embrión (Mayer y Poljakoff, 1975).

Las semillas maduras contienen bajos niveles de citocininas endógenas (Davey y Van Staden, 1979), los que permanecen bajos durante la germinación o elongación de la radícula.

Queda aun por establecer, si estos compuestos son sintetizados durante el desarrollo de la semilla o durante la germinación.

Miller (1958) mostró que la cinetina promueve la germinación de semillas de lechuga y que requiere adicionalmente de luz roja para la completa expresión de su efecto estimuladorio.

C) **AUXINAS:** A este grupo pertenecen el ácido indol acético (IAA) y sus derivados. Se sintetizan a partir de triptófano (Schneider y Weghtman, 1974).

Pueden estimular la germinación en condiciones muy especiales de luz y temperatura, pero normalmente tienen muy poco efecto. Lo que si parece claro, es que no existe respuesta por las semillas a concentraciones fisiológicas de IAA, aunque si en partes aisladas de la planta.

Predominan en la semilla en desarrollo, más que en la semilla madura. Se acumulan en el endospermo y disminuyen su nivel al alcanzar la madurez (Khan, 1982)

Las auxinas en la semilla se encuentran en forma combinada, ya sea con mio-inositol, arabinosa o enlazadas a  $\beta$ -1,4-glucanas (Nichols, 1967, Shantz y Stewart, 1957 y Piskornik y Bandursky, 1972).

No obstante existir una buena correlación entre los cambios en los niveles de auxinas y el desarrollo de la semilla, no se ha comprobado una posible relación con la germinación, por lo que los

cambios en los niveles de estas hormonas se analizan de manera mas conveniente, en relacion al desarrollo de la semilla.

También se especula, respecto al posible papel de la liberación de las auxinas libres, a partir de sus formas conjugadas, sobre el control del crecimiento de la planta (Ueda y col, 1970).

D) **ETILENO**: Su efecto debe ser considerado como el de un factor de regulación del crecimiento, ya que se ha mostrado que estimula la germinación de varias semillas (Jones, 1968), aunque no se tiene la certeza si su efecto es sobre el fin de la latencia o sobre la regulación del crecimiento inmediato a la puesta de la germinación. El etileno se forma muy rapido en cuanto empieza el periodo de imbibición de la semilla (Abeles y Lonskii, 1969).

El etileno puede aplicarse a las semillas en la forma del Acido 2-cloro-etano fosfónico, el cual se descompone a etileno en presencia de agua y un pH de 4.0 (Mayer y Poljakoff, 1975).

E) **ACIDO ABSICISICO**: El Acido absicisico constituye un regulador del crecimiento de plantas importante a considerar, ya que se ha comprobado tiene un efecto inhibitorio sobre el proceso de germinación (Flintham y Gale, 1988) Adicionalmente parece ser el responsable de la latencia de varias semillas, asi como de evitar la germinación prematura al controlar el crecimiento del embrión.

También inhibe varios fenomenos del crecimiento de las plantas, causando por ejemplo la abscisión de las hojas en algunas especies como algodón (Onkuma y col, 1963).

Su efecto puede ser revertido por el Acido giberelico y la luz (Chrispeels y Varner, 1967).

Se localiza en varias partes de la semilla, y aunque en algunos casos parece provenir de la planta madre, en *T. aestivum* parece sintetizarse en el embrión y en el endospermo a partir de mevalonato (Milborrow, 1974).

El ácido abscísico parece descomponerse a ácido fásico y dehidrofásico, durante la maduración de la semilla. Siendo posible que el abscísico sobreviva a la germinación sea el que ejerza junto con otras hormonas ( $GA_2$ ) una fracción del control de la germinación (Galson y col., 1974).

#### I.4.-LA MOVILIZACIÓN DE RESERVAS Y SU REGULACION

El establecimiento definitivo de la germinación de una semilla depende en gran medida, de que el embrión se abastezca de nutrientes alternos a los ya contenidos en este. En el caso de granos de cereales, estos nutrientes se encuentran en el endospermo de la semilla.

Esta etapa en el desarrollo de una semilla se conoce como *movilización de reservas*, es iniciada y controlada por una giberelina, cuya actividad da lugar a la síntesis y secreción al endospermo almidonado de varias hidrolasas, que degradan los nutrientes, los que a través de etapas subsiguientes del proceso de *movilización de reservas*, son asimilados por el embrión.

El proceso de *movilización de reservas* puede resumirse en las siguientes etapas: (figura I.5).

- a) *Síntesis y secreción* al endospermo almidonado, de enzimas hidrolíticas.
- b) *Hidrólisis* del contenido del endospermo almidonado (almidón, proteínas, lípidos, minerales).
- c) *Adaptación química* de los productos de hidrólisis para su posterior asimilación. Por ejemplo, el producto final de la hidrólisis del almidón, es una mezcla de maltosa y glucosa, ambos azúcares deben ser transformados a sacarosa en el escutelo, antes de ser asimilados por el embrión.
- d) *Transporte* de los productos de hidrólisis, hacia el embrión.

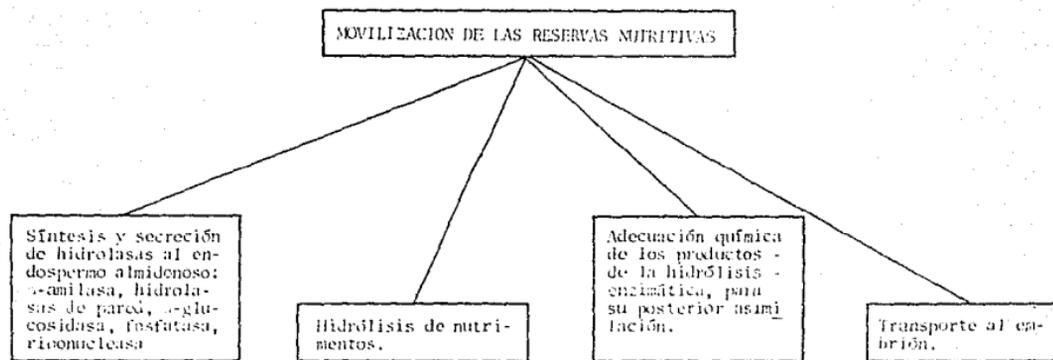


FIGURA 1.5 Etapas de la movilización de las reservas nutritivas de una semilla.

La síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas, además de constituir el inicio de la movilización de reservas y ser el paso limitante de esta, su estudio constituye un punto interesante a estudiar pues da la oportunidad adicional de incursionar en la investigación sobre el mecanismo de regulación seguido por el  $GA_3$ .

Respecto a la forma en la cual se produce esta síntesis y secreción de hidrolasas se acepta que, la giberelina proveniente del embrión, al interaccionar con las células blanco, presentes en la capa de aleurona, promueve en ellas varios cambios físicos, bioquímicos y fisiológicos, que las conducen a la síntesis y secreción al endospermo almidonoso, de enzimas hidrolíticas como  $\alpha$ -amilasa. Este proceso finaliza, cuando la plántula ha alcanzado el estado autotrófo. En la figura 1.6 se resume la relación entre la producción de  $GA_3$  por el eje embrionario y el escutelo, la producción de  $\alpha$ -amilasa por la capa de aleurona y la producción de solutos en el endospermo.

Al igual que la  $\alpha$ -amilasa, la proteasa,  $\alpha$ -glucosidasa, pentosanasa y dextrinasa límite, son enzimas que requieren la participación del  $GA_3$  para su síntesis y secreción (Bewley y Black, 1983).

Existe un segundo grupo de enzimas, cuya síntesis es independiente de la hormona, no así su liberación. Dentro de este grupo se ubican la  $\beta$ -1,3-glucanasa, la fosfatasa ácida y la ribonucleasa (Chrispeels y Varner, 1967 y Pollard, 1969).

Para que la giberelina pueda ejercer su acción, es necesario que la semilla complete su sistema vascular, ya que es la vía que le facilitará el transporte desde el sitio de síntesis hasta las células blanco (células de la capa de aleurona). Esta etapa toma alrededor de 5 horas a partir del momento de la imbibición (Bewley y Black, 1983).

No se ha establecido, si el  $GA_3$  tiene algún efecto directo, sobre la actividad de las enzimas que participan en la movilización de las reservas nutritivas contenidas en las células

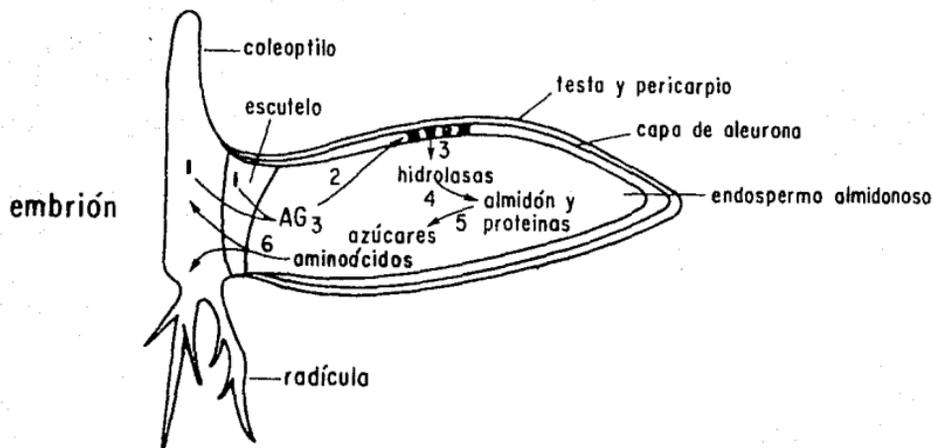


Fig.I.6 Relación entre la producción de  $GA_3$  y la formación de enzimas hidrolíticas con la producción de solutos al endospermo almidonoso (Jones y Armstrong, 1971).

(1) Síntesis de  $GA_3$  por el embrión.

(2) Migración de  $GA_3$  hacia la capa de aleurona con la consiguiente inducción de enzimas hidrolíticas.

(3) y (4) Hidrólisis de las reservas del endospermo almidonoso (almidón, proteínas, etc.).

(5) Utilización por el embrión, de los productos de hidrólisis.

de alicurona y escutelo, las que parecen estar ya presentes en el grano no germinado (Fincher, 1989).

El proceso de disolución del endospermo, lleva aparejada, la hidrólisis enzimática tanto de las paredes celulares de las células de aleurona como las del endospermo almidonoso.

Ambos tipos de paredes, están clasificadas como paredes celulares primarias, pues no contienen lignina. Están constituidas por hemicelulosas como arabinoxilanas y  $\beta$ -1,3 y 1,4-glucanas, que en el caso del trigo alcanzan porcentajes del 66% y 28% respectivamente (Bacic y Stone, 1981).

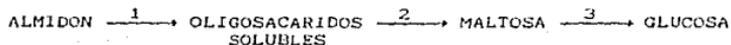
Las enzimas que participan en la hidrólisis de ambos tipos de las paredes celulares son xilanasas y 1,3 y 1,4-glucanasas. Su actividad es muy importante, ya que permite la entrada al endospermo almidonoso de enzimas como  $\alpha$ -amilasa y proteasa, lo que facilita el ataque de sus sustratos respectivos.

Además de GA<sub>3</sub>, las giberelinas GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>, GA<sub>22</sub>, parecen ejercer algún control en la movilización de reservas.

#### 1.4.1.- MOVILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS. PAPEL DE LA $\alpha$ -AMILASA

El almidón que es el carbohidrato más abundante en el endospermo de los cereales, es degradado vía la acción concertada de varias enzimas, que incluyen:  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa, enzima desramificadora, fosforilasa y maltasa

Otro factor que influye en la degradación del almidón, lo constituye la proporción de las dos formas principales de almidón (amilosa y amilopectina) por lo que la ruta de degradación puede ser relativamente diferente, en las diferentes semillas. La ruta propuesta para la degradación del almidón en chicharo, parece ajustarse a la siguiente secuencia (Swain y Dekker, 1966):



Participando las siguientes enzimas: 1)  $\alpha$ -amilasa, 2)  $\beta$ -amilasa y 3) maltasa

A diferencia de la  $\alpha$ -amilasa, cuya síntesis es *de novo*, las demás enzimas que participan en la degradación del almidón, como es el caso de la  $\beta$ -amilasa, ya existen dentro del grano seco y solo se activan durante la imbibición de la semilla. Su actividad aunque muy importante, solo explica una pequeña fracción del total de la actividad amilolítica, ya que el 90% de esta se debe a la  $\alpha$ -amilasa.

La enzima desramificadora continua hidrolizando las dextrinas límite, ya que tiene la capacidad de romper enlaces  $\alpha$ -1,6 glucosídicos, facilitando el trabajo a las amilasas.

De las enzimas cuya síntesis depende de  $GA_3$ , la  $\alpha$ -amilasa es la enzima que se forma en mayor proporción (60%) (Ho y Varner, 1974), lo que sería de esperar si tomamos en cuenta que el almidón representa el componente mayoritario del endospermo.

Adicionalmente a lo anterior, el método de medición de la actividad enzimática resulta ser relativamente sencillo y reproducible (Briggs, 1967).

Por lo anterior, parece justificado el emplear a la  $\alpha$ -amilasa como un monitor en el estudio del efecto del  $GA_3$  sobre la movilización de reservas, concretamente en la parte de ésta, que se refiere a la síntesis y secreción de enzimas.

El modelo experimental empleado en este estudio, ha consistido básicamente en el empleo de medias semillas desembrionadas y especialmente capas de aleurona aisladas.

Este modelo posee la característica, de que no obstante

separarse del resto de los tejidos de la semilla, las células de la capa de aleurona retienen la capacidad de responder específicamente al estímulo del  $GA_3$  adicionado exogenamente, al igual que en la semilla completa, dando la oportunidad de medir en el medio de incubación la actividad de alguna de las enzimas hidrolíticas inducidas por la fitohormona.

#### 1.4.1.1 INDUCCION DE $\alpha$ -AMILASA

Como ha sido mencionado, la síntesis y secreción de  $\alpha$ -amilasa esta bajo el control de una giberelina. Cuya síntesis *de novo* ha podido ratificarse, entre otros factores por el analisis del efecto inhibitorio causado en la producción de la enzima, por agentes como cicloheximida, la cual inhibe la síntesis de proteínas (Chrispeels y Varner, 1967).

La formación de  $\alpha$ -amilasa puede observarse experimentalmente, si se incuban capas de aleurona de cebada con  $GA_3$   $1\mu M$  y calcio por 24 horas, para finalmente medir la actividad de la enzima en el medio de incubación y en el tejido. La gráfica de la cinética de producción de  $\alpha$ -amilasa que se obtiene bajo las condiciones descritas se muestra en la figura 1.7.

En ellas puede observarse, que en ambos tejidos la enzima comienza a sintetizarse al medio hasta después de 8 horas de haber adicionado la hormona. Este periodo se conoce como fase *lag* ó de *retardo*.

A partir de las gráficas de la figura 1.7. puede observarse que en cebada, la mayoría de la enzima se secreta al medio, y que no sucede lo mismo con trigo, donde la mayor parte de la enzima permanece dentro del tejido a las 24 horas. Además ambas gráficas indican que no hay acumulación de la enzima durante la fase de retardo, y que la liberación comienza después de haberse rebasado éste periodo. Esta última observación indicaría que de tratarse de una síntesis *de novo*, durante la fase *lag* debe formarse el mRNA para la enzima.

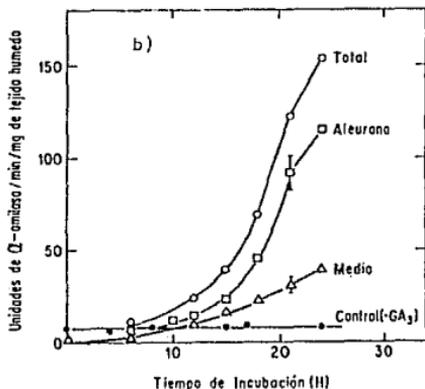
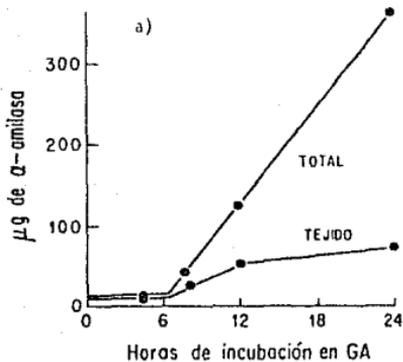


Fig. 1.7. Cinética de inducción de  $\alpha$ -amilasa en cebada y trigo.

Cebada: Cinética de la producción de  $\alpha$ -amilasa por 10 capas de aleurona de cebada variedad Himalaya, incubadas. La actividad enzimática se midió en el medio de incubación y en el sobrenadante de un extracto del tejido, la actividad total se refiere a la suma de estas dos actividades (Chrispeels y Varner, 1967).  
 Trigo: 10 capas de aleurona de trigo var. Potam S-70 se incubaron en 2 ml de medio de incubación en presencia y en ausencia de GA<sub>3</sub>. La actividad amilolítica se determinó en el medio de incubación y en el extracto. El total representa la suma de estas dos actividades. (Bernal, 1978).

Después del período lag, se observa una respuesta lineal, durante las siguientes 16 horas. Mientras que en el tejido la acumulación de la enzima se estabiliza a las 12 horas.

Es obvio a partir del análisis de la gráfica obtenida para trigo que la enzima requiere la adición de  $GA_3$ , pues se obtienen niveles muy bajos de enzima cuando la hormona no se adiciona.

Los cambios ultraestructurales observados por microscopía electrónica (Evins, 1971, Jones, 1969 y Gubler, 1966) durante la fase lag son congruentes con la elaboración de la maquinaria celular requerida para la síntesis del mensajero de  $\alpha$ -amilasa y su expresión, pues además de que los cuerpos globoides desaparecen, los cuerpos proteicos de la aleurona coalescen para formar grandes vacuolas, el número de esferosomas disminuye y las mitocondrias desarrollan una gran actividad metabólica, indicada por la formación de crestas bien definidas, existe una intensa proliferación de retículo endoplásmico y complejo de Golgi, los cuales son sistemas relacionados con la elaboración del aparato encargado de la síntesis de proteínas y de su modificación.

Basados en el hecho experimental de que la síntesis de  $\alpha$ -amilasa, corresponde en realidad a una síntesis *de novo* (Filner y Varner, 1967), se han realizado investigaciones con el fin de conocer el mecanismo por el cual el  $GA_3$ , causa esta inducción de enzimas.

Estos trabajos han ido encaminados a resolver si la hormona actúa a nivel de a) inducir la traducción ó b) la transcripción.

Siguiendo estas líneas de trabajo, se ha visto que la síntesis de  $\alpha$ -amilasa se detiene, si al medio de incubación de capas de aleurona de cebada, se adicionan inhibidores de síntesis de proteínas como cicloneximida, ratificando que el proceso corresponde a una síntesis *de novo* (Chrispeels y Varner, 1967).

Una situación similar ocurre en trigo cuando, se agregan paralelamente al medio de incubación  $GA_3$  e inhibidores de síntesis de RNA mensajeros (cordicepina y actinomicina D), pero no si éstos se añaden 12 horas después de la adición del  $GA_3$  (Bernal, 1978). Tal resultado indica que el mRNA para  $\alpha$ -amilasa se debe sintetizar durante las primeras 12 horas de la aplicación de la hormona.

Observando la figura 1.7 puede deducirse que éste mensajero parece ser relativamente estable, pues la síntesis de la proteína se mantiene por 24 horas.

Basados en el antecedente de que la producción de  $\alpha$ -amilasa obedece a una síntesis *de novo*, Higgins y col. (1976), proponen la hipótesis de que la hormona debe afectar los niveles del mRNA para  $\alpha$ -amilasa, el cual se ha visto en otros sistemas, contiene una secuencia poli- $A^+$  en el extremo 3', de manera que los autores aislan RNA-poli- $A^+$  de capas de aleurona de cebada estimuladas con  $GA_3$  y realizan la traducción *in vitro* del mensajero encontrando que, efectivamente el  $GA_3$  aumenta el nivel de mensajero para  $\alpha$ -amilasa, a partir de 3-4 horas de adicionada la hormona.

Bernal, L. (1978) utilizando una metodología similar a la de Higgins y col (1976), corrobora sus resultados solo que emplea para la traducción *in vitro*, un mensajero aislado a partir de capas de aleurona de trigo incubadas con  $GA_3$ .

Posteriormente, Bernal y col (1981), mediante el uso de cDNA específico para el mensajero de  $\alpha$ -amilasa, determinan que el mensajero aumenta alrededor de 40 veces en aleuronas que han sido incubadas por 16 horas con  $GA_3$ .

Rogers y Milliman (1983) aislan un clon complementaria al mRNA para  $\alpha$ -amilasa a partir de capas de aleurona de cebada inducidas con  $GA_3$ . Del análisis infieren que existen dos poblaciones de mRNA para  $\alpha$ -amilasa derivados de diferentes genes estructurales, cuya expresión está bajo el control del  $GA_3$ .

Baulcombe y Buffard (1983) concluyen, al traducir in vitro el RNA-poli A<sup>+</sup> aislado de capas de aleurona de trigo estimuladas con GA<sub>3</sub>, que este no solo aumenta la síntesis del mensajero para  $\alpha$ -amilasa, sino también la síntesis de otros 6 péptidos más.

Adicionalmente, a través de experimentos de hibridización en los que emplearon como sondas los cDNA obtenidos de los RNA-poli A<sup>+</sup> inducidos por GA<sub>3</sub>, muestran que el aumento promovido por la hormona, es más prolongado para el mensajero de  $\alpha$ -amilasa, que para los otros 6 mensajeros.

#### 1.4.1.2 ISOENZIMAS DE $\alpha$ -AMILASA.

En la actualidad es bastante claro, que la degradación del almidón es promovida realmente, por diversas isoformas de  $\alpha$ -amilasa. Este polimorfismo de proteínas es el resultado, de la expresión de dos familias de genes diferentes, más que de modificaciones postraduccionales (Nishikawa y Nobuhara, 1971).

La expresión de estos genes da lugar a dos grupos de proteínas que se han clasificado de acuerdo a su pI, inmunogenicidad y control genético en: el grupo isoenzimas de pI alto y el grupo de isoenzimas de pI bajo.

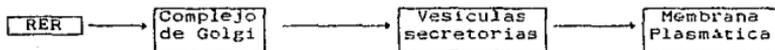
En trigo, estas familias de genes se denominan como  $\alpha$ -Amy1 a los que codifican para las isoenzimas de pI alto (5.3-7.5) y como  $\alpha$ -Amy2 a las que codifican para las isoenzimas de pI bajo (4.9-6.0) teniendo, 11 y 16 alelos respectivamente. Estos genes están codificados en los cromosomas 6 y 7 del genoma de trigo (Ainsworth y col., 1985)

En cebada se denomina como  $\alpha$ -AmyA, al grupo de genes que codifican para isoenzimas con un pI bajo (4.5-5.1) y como  $\alpha$ -AmyB a los genes cuya expresión da lugar a proteínas de pI alto (5.9-6.6). Para cada uno de estos grupos, se han aislado y caracterizado 2 isoenzimas. En el caso del genoma de cebada, estos genes están situados en los cromosomas 1 y 6.

Durante la germinación de la semilla de trigo, los grupos de isoenzimas mencionados no aparecen simultáneamente, ya que es el grupo de PI alto ( $\alpha$ -Amy1) el que aparece primero, acumulándose a través de la germinación, a diferencia del otro grupo ( $\alpha$ -Amy2) que lo hace posteriormente (Lazarus y col., 1985). Una situación similar parece ocurrir con los grupos de isoenzimas de cebada, solo que invertida, pues es el grupo de PI bajo ( $\alpha$ -AmyA) el que aparece primero y posteriormente lo hace el grupo de PI alto (Jacobsen y Higgins, 1982).

#### 1.4.1.3. SECRECIÓN DE $\alpha$ -AMILASA

La relación de los cambios observados por microscopía electrónica, (proliferación del retículo endoplásmico rugoso (RER) y complejo de Golgi, destrucción de los gránulos de aleurona y disminución del número de esferosomas), con los eventos fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante las primeras 10 horas de la inducción de  $\alpha$ -amilasa por  $GA_3$ , permiten construir un esquema de secreción para la enzima, semejante al propuesto para otros organismos eucariontes:



En plantas, este modelo no ha podido detallarse, debido especialmente a deficiencias en los modelos experimentales, quedando por dilucidar muchos aspectos, particularmente lo que se refiere a los sistemas secretorios específicos, así como el sitio donde éstos ocurren.

En el caso en el que la forma de secreción para  $\alpha$ -amilasa fuera vesiculada, como propone la secuencia arriba indicada, se ha diseñado un modelo basado en los estudios de la secreción de  $\alpha$ -amilasa empleando tejido escutelar de arroz (Ver figura 1.8).

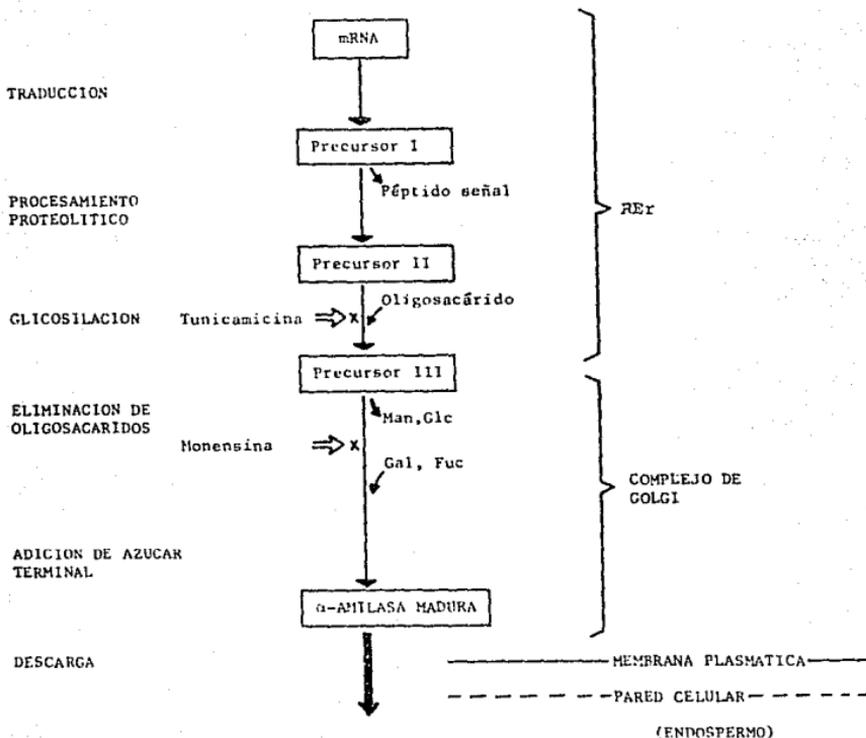


Figura 1.8 Mecanismo hipotético de la biosíntesis y transporte intracelular de  $\alpha$ -amilasa de semilla de arroz (Akasawa y Nishimura, 1985).

Algunas de las características de este modelo, incluyen el hecho de que la proteína sufre una hidrólisis, en la que se pierde el péptido señal, para pasar posteriormente por una glicosilación ocurriendo ambos procesos durante la traducción. (Miyata y Akasawa, 1982).

En el caso de arroz, estas etapas parecen llevarse a cabo en los ribosomas del retículo endoplásmico. Según se observa del esquema de la figura I.8, la glicosilación va precedida por la proteólisis. En trigo no se ha comprobado que la  $\alpha$ -amilasa sea una proteína glicosilada.

Uno de los puntos importantes de comprobar del modelo de secreción propuesto, lo constituye el paso de la proteína glicosilada, desde el RER al complejo de Golgi. Para tal fin se ha hecho uso de monensina, que en células de mamífero causa distensión de las cisternas del Golgi, bloquea la adición del azúcar terminal y disminuye la velocidad del transporte de proteínas secretorias. Desafortunadamente, esto no ha podido comprobarse en arroz, ya que es particularmente difícil aislar el complejo de Golgi y la incorporación de la droga ha sido parcial.

Dentro de las perspectivas de investigación dentro de esta área, se ha pensado en la localización dentro del complejo de Golgi, de enzimas relacionadas con la modificación de azúcares en la proteína, como  $\alpha$ -manosidasa y fucosil transferasa, a fin de comprobar la topografía del modelo propuesto para la síntesis de  $\alpha$ -amilasa (Akasawa y Nishimura, 1985).

#### I.4.2 MOVILIZACION DE MINERALES

La capa célula de aleurona contiene la mayor reserva de minerales de la semilla ( 70%), la cual se encuentra en la forma de una sal mixta del ácido fítico, llamada fitina (Tronier y col.,1971).

Su movilización depende de la actividad de la enzima fitasa, la que hidroliza a la fitina produciendo fosfato, los cationes asociados ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) y mio-inositol (Ver fig.1.2)

La fitasa es una enzima que se ha aislado de los cuerpos proteicos de la capa de aleurona (gránulos de aleurona), pero no de los cuerpos proteicos del endospermo almidonoso.

La fitasa ya está presente en granos de trigo y cebada sin germinar, con una actividad lo suficientemente alta para hidrolizar toda la fitina del grano, además los cationes asociados a la fitina pueden solubilizarse por la sola hidratación del tejido (Eastwood y Laidman, 1971). Tal situación vuelve paradójica la presencia de la fitasa en tales semillas.

En trigo, los niveles de la enzima aumentan durante el primer día de la germinación, pero el  $\text{GA}_3$  no parece intervenir en esta activación, papel que se le ha atribuido a algún otro factor proveniente del embrión, presumiblemente algunos compuestos nitrogenados como glutamina (Eastwood y Laidman, 1971).

El  $\text{GA}_3$  si parece estar relacionado con la liberación de los iones presentes en la fitina, pues se ha observado que ocurre una rápida liberación de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y fosfato, después de 6-8 horas de haber adicionado la hormona. Aunque no se conoce el mecanismo a través del cual interviene el  $\text{GA}_3$  se ha especulado que pudiera favorecer la formación de sistemas acarreadores de iones dependientes de energía, dentro de la membrana celular facilitando así, la liberación de los iones dentro de la célula de aleurona (Jones, 1973).

Aunque en el embrión y en el eje escutelar, existen reservas de fitina, estas son muy pequeñas comparadas con las de la capa de aleurona, no considerándose con significado para la germinación y no obstante que estos tejidos contienen fitasa,

ésta permanece continuamente inhibida por la afluencia de iones fosfato provenientes de la aleurona (Bianchetti y Sartivana, 1967).

El hecho de que los iones fosfato sean inhibidores de la fitasa, indica que la actividad de la enzima presente en la aleurona debe estar regulada por el nivel de fosfatos liberados.

El movimiento de los cationes liberados desde la capa de aleurona a la plántula, parece suceder por difusión simple a través del endospermo.

## I.5 PAPEL DEL CALCIO EN LA INDUCCION DE $\alpha$ -AMILASA

### I.5.1 CALCIO EN LA SECRECION DE $\alpha$ -AMILASA

En este momento está bien documentado, que el calcio tiene un papel definido en el transporte intracelular y en la liberación de algunas proteínas de varios sistemas secretorios animales, dentro de los que se pueden mencionar como ejemplos bien conocidos a la secreción de insulina y la  $\alpha$ -amilasa por células pancreáticas.

En plantas, Chrispeels y Varner (1967) fueron de los primeros investigadores que estudiaron el efecto de calcio en la inducción de  $\alpha$ -amilasa, estableciendo que la adición de 20mM de  $\text{CaCl}_2$  a capas de aleurona de cebada incubadas con  $\text{GA}_3$ , aumenta la secreción de  $\alpha$ -amilasa al doble de lo que se incrementa en medias semillas incubadas bajo condiciones idénticas.

Los resultados anteriores indican que, la producción de  $\alpha$ -amilasa por estos sistemas experimentales, requiere de la adición exógena de calcio y dado que las medias semillas muestran niveles menores de  $\alpha$ -amilasa que las capas de aleurona al adicionar a ambas la misma concentración de  $\text{CaCl}_2$ , se puede pensar que los tejidos externos a la aleurona (presentes en la

media semilla, pero no en la capa de aleurona) poseen el calcio necesario para la inducción.

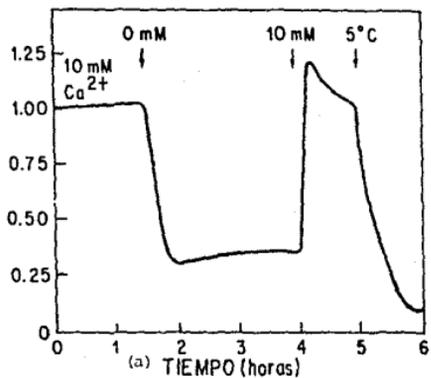
Basados en el hecho de que la  $\alpha$ -amilasa es una enzima de exportación, Varner y Mense (1972) proponen que la exportación de la enzima se da en dos etapas separables: a) el transporte de la enzima a través de la membrana (secreción) y b) su liberación a través de la pared de la aleurona hacia el endospermo, siendo esta última facilitada por cationes.

Moll y Jones (1982) empleando el mismo sistema que usan Varner y Mense (capas de aleurona) para estudiar el efecto del calcio en la secreción de  $\alpha$ -amilasa, encuentran que la etapa limitante en ésta, es el paso por la membrana plasmática y no por la pared, ya que si el paso limitante fuera la difusión de la enzima a partir de un gran depósito presente en la pared celular, entonces la disminución de la temperatura o la presencia de un osmolito como variables experimentales, no hubieran afectado la secreción, como realmente lo hicieron (figura I.9.) Además al medir cinéticas de secreción de la enzima, encuentran que la secreción de  $\alpha$ -amilasa tiene una marcada dependencia por calcio, pues en su ausencia, la velocidad de la secreción es solo un 20% a 30% de la que se obtiene en la presencia de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  (figura I.10).

Los resultados encontrados por (Rodríguez, 1989) indican que en trigo, el calcio también es necesario para la producción de la enzima. Lo anterior puede deducirse de la figura I.11 donde se pone de manifiesto que a medida que se incrementa la concentración de EGTA, (un quelante con una alta especificidad para calcio) en el medio de contiene capas de aleurona incubadas con  $\text{GA}_3$ , disminuyen los niveles totales detectados de la enzima, los que pueden restituirse si se elimina el EGTA del medio de incubación y se adiciona 20 mM de cloruro de calcio.

Jones y Jacobsen, (1983) estudian el efecto que tiene el calcio en la regulación de la secreción de la  $\alpha$ -amilasa y de otras proteínas empleando capas de aleurona de cebada, a las que

VELOCIDAD DE LIBERACION DE  $\alpha$ -AMILASA  
(UNIDADES RELATIVAS)



VELOCIDAD DE LIBERACION DE  $\alpha$ -AMILASA  
(UNIDADES RELATIVAS)

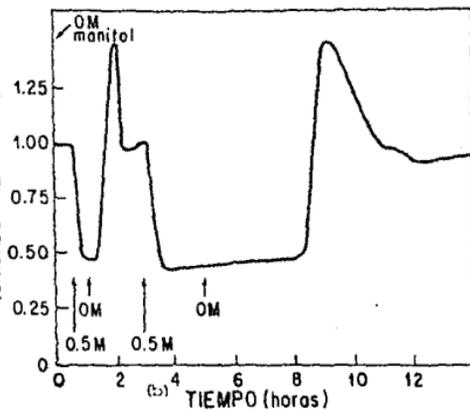


Fig. 1.9 Efecto de la temperatura (a) y de osmólitos (b) sobre la secreción de  $\alpha$ -amilasa (Moll y Jones, 1982).

(a). Se incubó una capa de aleurona de cebada con  $GA_3$  y 10 mM de calcio y después de alcanzar un estado estable en la secreción de la enzima se cambió la temperatura del sistema de incubación de 25°C a 5°C y se cuantificó la actividad de  $\alpha$ -amilasa secretada al medio.

(b). Bajo las mismas condiciones experimentales se evaluó el efecto de la presión osmótica sobre la secreción de la enzima, dando pulsos con 0.5 M de manitol.

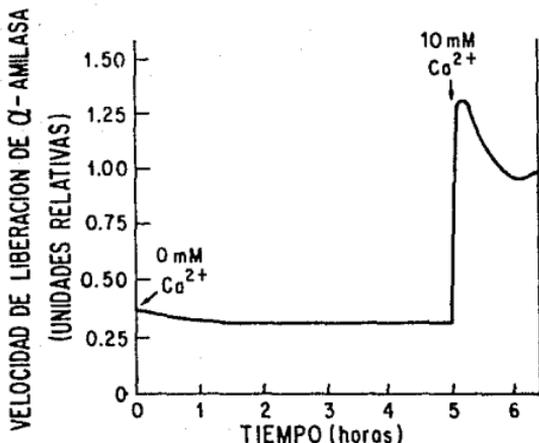


Fig.I.10. Efecto del cambio en la concentración del calcio presente en el medio de incubación sobre la secreción de  $\alpha$ -amilasa de cebada (Moll y Jones.1982)

Se incubaron capas de aleurona de cebada con  $GA_3$  y 10 mM de calcio hasta alcanzar un nivel estable en la secreción de  $\alpha$ -amilasa, después de lo cual se continuó la incubación en medio sin calcio y se midió la secreción de la enzima a los tiempos indicados.

## EFFECTO DE EGTA SOBRE LA SINTESIS DE $\alpha$ -AMILASA

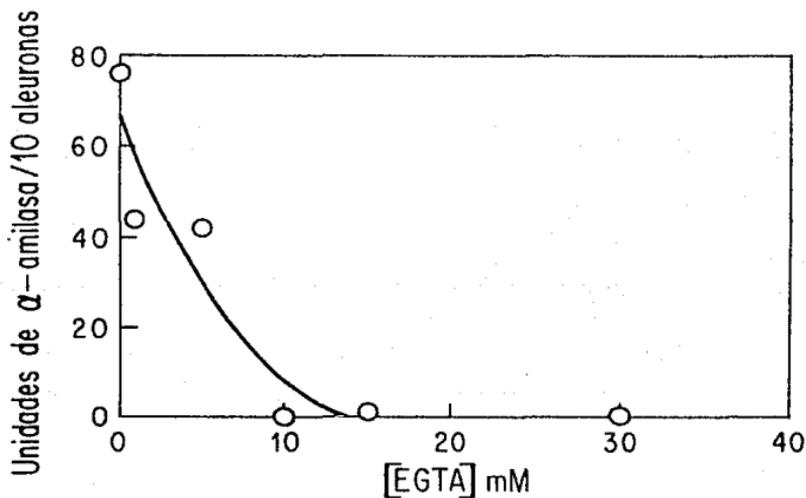


Fig.I.11. Efecto del EGTA sobre la producción de  $\alpha$ -amilasa.  
(Rodríguez, 1989).

Se midió la actividad total de la  $\alpha$ -amilasa producida por 10 capas de aleurona de trigo incubadas por 24 h en un medio a pH 4 que contenía 1  $\mu$ M de  $GA_3$ , 20 mM de succinato y diferentes concentraciones de EGTA.

después de haber sido incubadas con  $GA_3$  y  $Ca^{2+}$  por 24 horas. se les elimina éste último, observando que la secreción de la enzima se reduce en un 70%-80%, respecto de la que se obtiene en presencia de 10 mM de  $CaCl_2$  y que ésta disminución en la secreción, es paralela con una disminución en la secreción de las isoenzimas del grupo B (pI alto), mientras que la del grupo A es independiente de la presencia de calcio en el medio. Estos resultados se ilustran en la figura I.12.

### I.5.2. EL CALCIO EN LA SINTESIS DE $\alpha$ -AMILASA

Existen algunos hechos experimentales que indican que el calcio participa no solo en la secreción de  $\alpha$ -amilasa sino también en la síntesis de la enzima, como se puede poner en evidencia del trabajo de Jones y Carbonell (1984), en el que analizan el patrón de isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa obtenidas de capas de aleurona de cebada, concluyendo que la síntesis del isogrupo de pI alto ocurre, cuando la composición del medio de incubación incluye además de  $GA_3$ , una concentración de 0.5 mM de  $CaCl_2$ , lográndose la saturación en la secreción con 20mM de  $CaCl_2$ , mientras que las isoenzimas de bajo pI no parecen requerirlo en su síntesis.

Por su parte, Mitsui y col (1984) miden el efecto de calcio en la síntesis de  $\alpha$ -amilasa de tejido escutelar de arroz, al determinar la incorporación de ( $^{35}S$ -)-metionina en la enzima, encontrando que su síntesis se satura con 0.5mM de  $CaCl_2$ , mientras que la secreción requiere niveles mayores de 10mM.

Adicionalmente, estudian que el ionóforo de calcio A-23187, promueve la biosíntesis y secreción de la enzima.

Diekman y Jones (1985) además de ratificar las evidencias obtenidas por otros investigadores, ya presentadas en ésta sección, obtienen un cDNA para  $\alpha$ -amilasa, con el que miden los niveles de mRNA para la enzima, aislados de capas de aleuronas

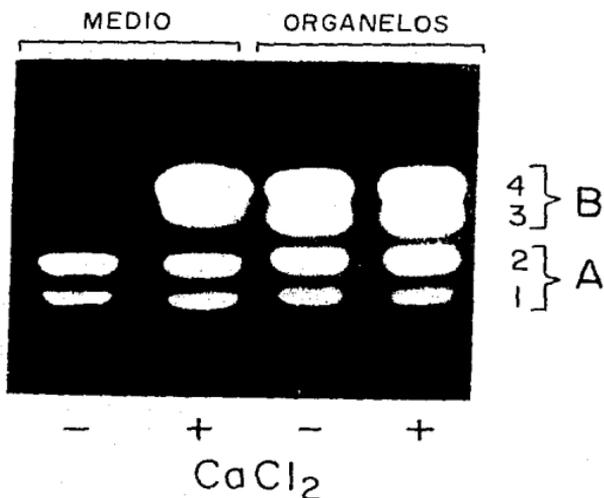


Fig. I.12. Efecto de la adición de calcio sobre la secreción de las isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa.

Capas de aleurona se incubaron en medio con  $\text{GA}_3$  y con o sin calcio durante 2 h después de haber sido incubadas en presencia de calcio por 22 h. Las proteínas secretadas al medio y presentes en los organelos fueron separadas por electroforesis en agar y las isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa fueron visualizadas por su actividad. A la derecha de la figura se señalan las posiciones de los diferentes grupos de isoenzimas (Jones y Jacobsen, 1983).

que fueron incubadas por 13 horas con  $GA_3$ , con y sin 5mM de  $CaCl_2$ , y no encuentran diferencias en el nivel del mensajero en ambos tratamientos, por lo que concluyen que el calcio no promueve un aumento en los niveles del mensajero de la enzima.

En arroz, el calcio parece ejercer un efecto a nivel post-traduccionnal sobre la producción de la enzima, pues existen evidencias de que influye en la formación de dos tipos de enzima, cada una con diferente sensibilidad para la concentración de calcio (forma S y forma R).

Se piensa que los dos tipos de proteínas están regulados diferencialmente por  $Ca^{2+}$  y calmodulina y que cada enzima se transporta intracelularmente a una velocidad característica, hasta ser descargada en el endospermo (Akasawa y Nishimura, 1985). En trigo este aspecto se desconoce.

Los efectos generales del calcio en la inducción de  $\alpha$ -amilasa, observados en capas de aleurona, parecen repetirse al usar como modelo experimental, protoplastos de aleurona (Bush y col. 1986).

Adicionalmente a estos resultados, se reportó que la concentración de calcio citoplásmico cambia en función del nivel de calcio externo, lo que afecta directamente el nivel de  $\alpha$ -amilasa secretada por protoplastos de aleurona de cebada incubados con  $GA_3$ , en ausencia y en presencia de 20 mM de  $CaCl_2$ , encontrando que cuando existe calcio externo, la concentración interna de éste es 60% más alta que la que se mide cuando no hay calcio en el medio de incubación. Igualmente la producción de la enzima se favorece alrededor de 20 veces en el caso de los protoplastos incubados con 20 mM de  $Ca^{2+}$ . Del mismo trabajo es posible deducir que las reservas internas de calcio presentes en las células de aleurona, parecen no participar en la producción de la enzima, siendo necesario adicionarlo al medio de incubación. (Bush y Jones, 1988).

Las evidencias hasta aquí presentadas, sugieren que el calcio externo tiene un papel funcional en la producción de algunas hidrolasas producidas por la capa de aleurona de cebada y trigo estimuladas por  $GA_3$ , requiriéndose éste a un nivel que va de 10 a 20 mM para obtener una completa secreción de estas enzimas, por lo que basado en estos antecedentes Stewart y col. (1988), establecen empleando la técnica de activación de neutrones, que en la semilla de cebada, la capa de aleurona es la que contiene la mayor proporción del calcio total de la semilla, resultado que sugiere que este tejido, junto con el endospermo almidonoso pudieran actuar como reservorios del ion, factibles de usarse para la inducción de  $\alpha$ -amilasa.

## CAPITULO II OBJETIVOS

El estudio del mecanismo de la regulación por  $GA_3$  en la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas, dentro de las que se encuentra la  $\alpha$ -amilasa, proporciona la oportunidad de abordar el proceso desde un punto de vista bioquímico, cuyo mecanismo se antoja pudiera ser parte de una estrategia general del metabolismo en eucariontes, incluyendo a las plantas.

En alguna parte del proceso de inducción de  $\alpha$ -amilasa mediado por ácido giberélico, se requiere calcio. Según las evidencias antes presentadas, el calcio tiene un papel claro a nivel de secreción y síntesis de la enzima, y no en la síntesis del mensajero.

El hecho de que con cualquiera de los diferentes modelos experimentales que se emplean en el estudio del efecto del ácido giberélico (capas de aleurona de trigo, cebada, escutelo de arroz y protoplastos de cebada), es necesario adicionar calcio al medio de incubación en un rango que va de 10mM a 20mM, sugiere que este debe de provenir de alguna fuente externa a la aleurona. Siendo posible atribuir este papel a alguno de los tejidos que rodea a la célula.

Mientras que en cebada, se conoce que el calcio ejerce una influencia marcada sobre todo en lo que respecta a la síntesis y secreción de las isoenzimas de pI alto, en trigo esto se desconoce, no obstante que se tiene la evidencia de que la producción de la enzima al igual que en cebada, requiere calcio.

No obstante que, la célula de aleurona contiene reservorios internos de calcio (mitocondrias, RER, fitina), el calcio empleado en la inducción no parece ser éste. En caso de serlo, debe ser inmediatamente reemplazado, posiblemente a partir de alguna fuente externa.

Basados en la premisa anterior, se ha planteado que el espacio extracelular pudiera servir como una fuente de calcio fácilmente accesible a la célula (Ferguson y Drobak, 1988).

Se han realizado pocos intentos para medir el calcio de los espacios que rodean a la aleurona. En uno de ellos se establece, que en el grano de cebada, la capa de aleurona es la que contiene la mayor proporción de calcio de la media semilla, siguiendo en orden de importancia el endospermo almidonoso (Stewart y col., 1988).

A la fecha no existen reportes respecto a la distribución de calcio en la semilla de trigo.

Asimismo es importante no soslayar el hecho de que para obtener las capas de aleurona, se sigue una metodología que incluye, una esterilización superficial con hipoclorito de sodio y una imbibición en agua por 24 horas en el caso de trigo y de 3 días en el caso de cebada. Tal procedimiento podría tener un efecto sobre la solubilización de calcio, el que pudiera tener casualmente, alguna ingerencia en el proceso de inducción de la  $\alpha$ -amilasa.

Basados en las evidencias presentadas se han planteado los siguientes objetivos:

- a) Determinar los niveles de calcio total en diferentes regiones de la media semilla desembrionada de trigo.
- b) Analizar si en algún paso de la metodología seguida en la obtención de las capas de aleurona, se pierde calcio y en caso de presentarse esta situación, establecer si éste tiene algún efecto en la inducción de  $\alpha$ -amilasa.
- c) Establecer qué tejido de la media semilla, es el que aporta el calcio para la inducción de la enzima.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### III.1 Reactivos y material.

La pureza de los reactivos empleados en este trabajo fué grado analítico (R.A.). Dentro de estos se incluyen ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), yodo ( $\text{I}_2$ ), yoduro de potasio ( $\text{KI}$ ), ácido etilén glicol-bis( $\beta$ -amino etil eter)-N,N tetra-acético (EGTA), cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), cloruro de lantano ( $\text{LaCl}_3$ ), acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), succinato de sodio ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4\text{Na}_2$ ) y antibióticos (cloramfenicol y estreptomocina).

Se empleó almidón soluble marca Merck, mientras que el  $\text{GA}_3$  fué Sigma.

El hipoclorito de sodio usado para esterilizar las medias semillas, fué marca Cloralex.

El agua empleada en todos los casos, fué agua desionizada, con una conductividad menor de  $1 \mu\text{mho}$ .

En los casos donde fué necesario esterilizar soluciones, se hizo empleando una autoclave a  $1.1 \text{ Kg/cm}^2$  y  $120^\circ\text{C}$  o a través del uso de filtros millipore tipo HA  $0.45 \mu\text{m}$ .

El material de vidrio, siempre se uso despues de haber sido lavado con  $\text{HNO}_3$  al 10% y lavado profusamente con agua desionizada

#### III.2 OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

En este trabajo se empleó semilla de trigo (*T. aestivum*), var. Tonichi, cosecha 1985-1986, donada por Pronase.

Para el trabajo se seleccionaron las semillas que retuvieran su integridad física, con un tamaño uniforme, eliminándose las semillas rotas y de color obscuro.

La germinación promedio de las semillas usadas en el trabajo fue de 95%. medida esta a las 24 horas de imbibición en cajas de Petri, a 25°C y en la obscuridad.

### III.3.1 IMBIBICION DE LAS MEDIAS SEMILLAS

Una media semilla se puede definir operacionalmente como la parte de semilla, a la que se le ha eliminado mediante un bisturi, el embrión y la parte distal a éste. Basados en esta definición se procedió a su obtención para posteriormente proseguir con el proceso de imbibición, por lo que se obtuvieron lotes de 50 medias semillas, las que se esterilizaron con 25ml de solución al 0.5% cloro activo, por un periodo de 15 minutos, después de ésta etapa se lavarón 6 veces, con porciones de 10ml de agua desionizada.

Esta agua se recolectó cuantitativamente y se unió al agua de esterilización, para finalmente procesarla y medir el calcio que se hubiera extraído durante el proceso (consultar sección III.3.3).

Esta esterilización afecta solo la superficie de las medias semillas, y tiene por objeto eliminar alguna posible fuente de contaminación, principalmente de naturaleza fungica, la cual pudiera interferir en los experimentos posteriores donde éstas fueran a usarse.

Posteriormente, las medias semillas tratadas con hipoclorito de sodio, se transfirieron a cajas de petri de 9cm de diametro estériles, conteniendo 10 ml de agua desionizada. Las cajas se sellaron con cinta parafilm y se incubaron a 25°C por 24 horas, en la obscuridad.

### III.2.2 AISLAMIENTO DE CAPAS DE ALEURONA Y ENDOSPERMOS ALMIDONOSOS

Después de transcurrido el periodo de imbibición, el agua residual de las cajas que contenían las medias semillas, se recolectó cuantitativamente para medir el calcio solubilizado durante el proceso. y se procedió a separar las medias semillas en sus componentes: capa de aleurona y endospermo almidonoso, auxiliándose con una espátula, con la que se presionó el centro de la media semilla, obteniéndose el endospermo almidonoso. Las capas de aleurona ya obtenidas se lavan con 10 ml de agua desionizada, la que se une a los endospermos obtenidos. En la figura III.1 se muestra un diagrama de este proceso.

Una vez obtenidos los tejidos, éstos se procesaron para la determinación de calcio (consultar sección III.3.3).

Cuando las capas de aleurona iban a emplearse para estudiar el efecto de  $GA_3$ , su obtención se realizó en condiciones de esterilidad, conservándolas a  $4^{\circ}C$ , hasta su utilización.

### III.2.3 INCUBACION DE CAPAS DE ALEURONA CON $GA_3$ .

La incubación de capas de aleurona bajo las diferentes condiciones experimentales de  $GA_3$  y  $Ca^{2+}$  determinadas para cada caso, tienen por objetivo central evaluar, a través de la actividad de  $\alpha$ -amilasa, la participación del calcio de la capa de aleurona de la semilla de trigo.

La composición del medio de inducción fué la siguiente: succinato de sodio 5mM, sulfato de estreptomycin 50 $\mu$ g/ml, cloramfenicol 50 $\mu$ g/ml. En los casos en los que el medio contenía  $CaCl_2$  y  $GA_3$  estos se usaron en una concentración de 20mM y 1 $\mu$ M respectivamente.

La inducción se realizó en matraces Erlenmeyer de 50ml estériles, empleando una relación de 10 capas de aleurona por 2ml de medio de inducción, a una temperatura de  $25^{\circ}C$ , por 24 horas y un pH de 5.8 en el caso del experimento descrito en la sección

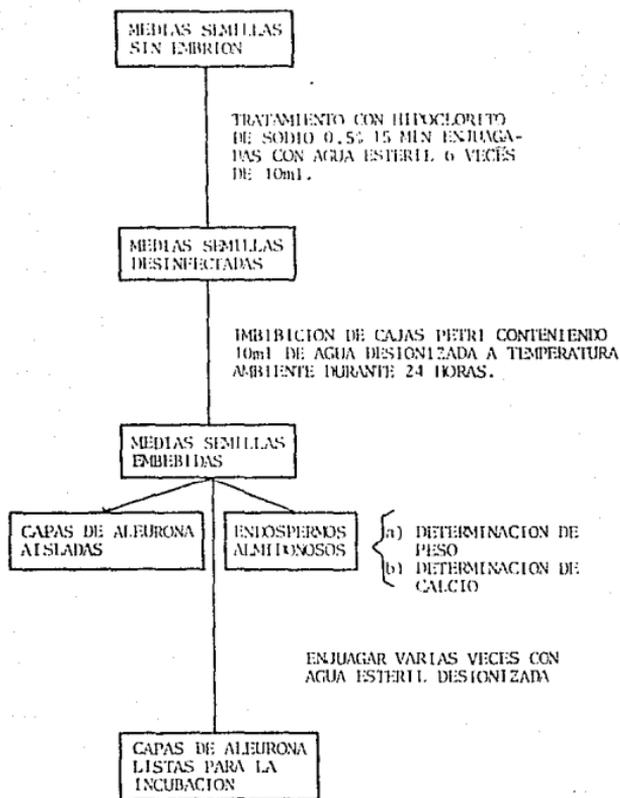


FIGURA III.1 OBTENCION DE LAS CAPAS DE ALEURONA Y ENDOSPERMOS ALMIDONOSOS.

IV.2. mientras que para el experimento descrito en la sección IV.4, el pH de la inducción fué de 4.0.

Después de transcurrido el periodo de inducción, tanto el medio como el tejido se dividieron en dos fracciones: una de ellas para medir el calcio y la otra para medir la actividad de  $\alpha$ -amilasa.

En el caso de no medirse la actividad enzimática inmediatamente después de terminado el periodo de inducción, el medio y el tejido se conservaron congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . En la figura III.2 se muestra un esquema de este proceso.

#### III.2.4 TRATAMIENTO DE CAPAS DE ALEURONA CON EGTA Y $\text{H}_2\text{O}$

Estos experimentos de lavados tienen por objetivo explorar si el calcio de la capa de aleurona que participa en la inducción de  $\alpha$ -amilasa realizada bajo las condiciones descritas en la sección III.2.3, puede ser solubilizado ya sea con EGTA ó con agua.

En caso de ser así, el efecto se reflejará en una disminución del nivel de  $\alpha$ -amilasa. De modo que al encontrar las condiciones de lavado que afectan la producción de la enzima, nos permitirá adicionalmente, determinar el nivel de participación del calcio de la capa de aleurona que participa en la inducción de la enzima.

Empleando la misma proporción de aleuronas que la usada en la sección III.2.3 y 5ml de solución de EGTA 10mM, pH7.0, el tejido se lavó dos veces, empleando 15 minutos en cada lavado. Después de ésta etapa se eliminó el EGTA residual, lavando el tejido, varias veces con agua desionizada. Finalmente, las aleuronas se lavaron una vez con 3ml de medio de inducción.

Este mismo proceso se siguió como parte de otro tratamiento, pero empleando agua desionizada, en lugar de EGTA.

La incubación de las aleuronas se realizó bajo las condiciones descritas en la sección III.2.3. Después de

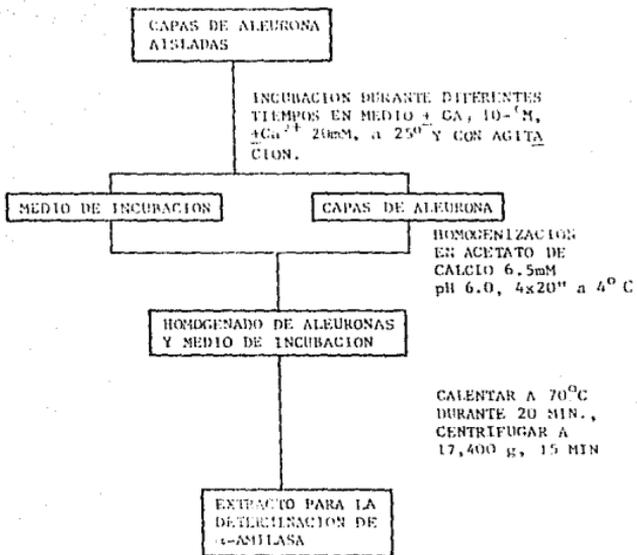


FIGURA III.2 Incubación de las capas de aleurona y preparación de los extractos para la determinación de α-amilasa.

transcurrido el periodo de inducción se procedió a procesar las muestras para medir la actividad enzimática.

### III.3. METODOS ANALITICOS

#### III.3.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE $\alpha$ -AMILASA

Para esta determinación se siguió el metodo de Brigs (1967), basado en medir la disminución del complejo almidón-yodo, debida a la degradación del almidón, en función de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa y del tiempo de incubación.

#### REACTIVOS:

a) Acetato de calcio 6.5mM, pH 6.0

b) Sustrato: se suspendieron 0.0625g de almidón soluble en 5 ml de agua bidestilada; la suspensión se calentó a ebullición por 1.5 minutos y se enfrió a temperatura ambiente, luego se le agregaron 0.5ml de NaCl 250mM y 0.5ml de acetato de calcio 325mM pH 6.0. La solución se aferró a 25 ml con agua bidestilada. Esta solución se usa recién preparada. c) Solución de yodo-yoduro de potasio: se disolvieron 40g de yoduro de potasio en agua bidestilada, se le agregaron 2.54g de yodo resublimado. Después de disolver ambos reactivos, se llevan a un volumen de 100ml con agua bidestilada. En el momento del ensayo, esta solución se diluye 1:200 con agua bidestilada.

#### PREPARACION DEL EXTRACTO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE $\alpha$ -AMILASA

Las capas de aleurona (10) se homogeneizaron a 4°C, con 3ml de acetato de calcio 6.5mM, pH 6.0, en un homogeneizador tipo Potter con émbolo de teflón por 4 periodos de 20 segundos de revolido a 1800 rpm, con intervalos de 10 segundos de descanso, para evitar el calentamiento de las muestras.

El homogenado se unió al medio de incubación (2ml) y esta mezcla (medio más tejido) se calentó a 70°C, durante 20 minutos para inactivar a la  $\beta$ -amilasa.

Posteriormente se centrifugó a 4°C a 17.000g en un rotor Sorvall SS-34 durante 15 minutos. El sobrenadante se denominó extracto y se utilizó para medir en él, la actividad total de  $\alpha$ -amilasa. En la figura III.2 se esquematiza el proceso.

La actividad enzimática en el medio de incubación se realizó después de agregar un ml de acetato de calcio 6.5mM y ajustar el pH del medio a 5.0 e inactivando la  $\beta$ -amilasa.

#### ENSAYO ENZIMATICO DE LA $\alpha$ -AMILASA

A 600 $\mu$ l de sustrato se le agregaron 200 $\mu$ l del extracto diluido apropiadamente, se incubó a temperatura ambiente y a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 8, y 10 minutos), se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l, las que se transfirieron a tubos que contenían 5ml de la solución 1:200 de yodo-yoduro de potasio. La absorbencia de las muestras se obtuvo a 565nm

La solución de yodo al mismo tiempo que forma el complejo de color con el almidón, detiene la actividad enzimática.

La muestra debe diluirse de tal forma que produzca cambios de absorbencia iguales o menores que 0.05DO/10 minutos, para tener la seguridad de estar trabajando en el rango donde la reacción enzimática es lineal respecto al tiempo.

Una unidad de  $\alpha$ -amilasa se definió como la cantidad de enzima que cambia la absorbencia en 0.001 unidades de absorbencia/minuto/ml de preparación enzimática.

#### III.3.2. EXTRACCION DE CALCIO SOLUBLE

Con el procedimiento descrito a continuación se pretende tener una preparación que contenga principalmente, el calcio iónico, soluble en agua a 2°C excluyendo el calcio enlazado a ácido fítico, el cual es poco soluble bajo las condiciones de la extracción (Jones, 1973).

La técnica seguida consistió en macerar (10 aleurones) el tejido en un mortero con nitrógeno líquido hasta tener una harina fina, después se pasó a un homogenizador donde se molió con 3ml de

agua desionizada a 2°C por 2 periodos de 20 segundos, descansando 10 segundos entre cada uno ellos. El homogenado se centrifugo 17,000g, empleando un rotor SS-34 durante 15 minutos a 4°C. En el sobrenadante se determinó el calcio por espectroscopia de absorción atómica.

### III.3.3 PREPARACION DE MUESTRAS PARA LA DETERMINACION DE CALCIO TOTAL

El método esta basado en obtención de las cenizas totales del tejido, a través de una incineración de la muestra a 600°C, con lo que el calcio enlazado a compuestos orgánicos, pasara a una combinación inorgánica. De esta manera resulta relativamente fácil disolver el calcio total (calcio inorgánico más calcio orgánico) con HCl concentrado. La cantidad de calcio se determinó por espectroscopia de absorción atómica.

La metodología consistió en pesar en un crisol de porcelana alto, previamente puesto a peso constante, la cantidad apropiada de tejido ( medias semillas, capas de aleurona o endospermos almidonosos ), tal que produjera lecturas de absorbencia entre 0.2 a 0.6. Después de lo cual se adicionó 1.0ml de  $H_2SO_4$  y 0.5ml de  $HNO_3$ , se quemó parcialmente empleando una parrilla a muy baja temperatura para no tener proyecciones de la muestra. Después de esta etapa se continuó la combustión en un mechero Fisher hasta que no se observó la emisión de gas. Finalmente las muestras se quemaron hasta cenizas blancas en una mufla a 600°C.

Después de que las muestras se enfriaron, las cenizas se disolvieron con 1ml de HCl concentrado. Finalmente, las muestras se aforaron a un volumen conocido, el que incluía cloruro de lantano a una concentración final de 0.5%.

Para medir el calcio extraído durante la esterilización superficial de las medias semillas, a las muestras de agua se les adicionó cloruro de lantano hasta una concentración final de 0.5%, después se centrifugaron a 13,000 r.p.m. para separar el almidón, finalmente después de llevarlas a un volumen apropiado, se leyó la absorbencia a una longitud de onda de 422.7 nm.

Las muestras que contenían el agua de imbibición, se les adicionó el cloruro de lantano, se aclararon con agua desionizada a un volumen conocido, para finalmente tomar la lectura de absorbencia.

#### III.3.4 DETERMINACION DE CALCIO POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATÓMICA

El calcio total y el calcio soluble se determinaron por espectroscopia de absorción atómica.

Se usó un aparato marca Perkin-Elmer modelo 560, con una lámpara de cátodo hueco de la misma marca. Las lecturas se hicieron a una longitud de onda de 422.7nm. La flama se obtuvo a partir de una mezcla acetileno:aire (1:3).

La curva patrón se preparó a partir de una solución stock con 1mg de calcio/ml, la que se diluyó hasta tener la solución de trabajo (100µg/ml). De ésta última se tomaron diversas alícuotas a modo de cubrir absorbencias de 0.1 a 0.7. A cada una se le adicionó cloruro de lantano hasta tener una concentración final de 0.5%.

#### III.3.5. DETERMINACION DEL PESO SECO.

Un número conocido de medias semillas, endospermos almidonosos y capas de aleurona (15 ó 50), obtenidos éstos últimos, según la metodología descrita en la secciones III.2.1 y III.2.2, se pesaron en un crisol previamente puesto a peso constante y se introdujeron a una estufa a una temperatura de 70°C-80°C, hasta obtener el peso constante. Finalmente se calculó el peso de cada una de las regiones de la media semilla.

#### IV. RESULTADOS

##### IV.1 Niveles de calcio total y su distribución en tejidos de la media semilla de trigo.

La determinación de los niveles de calcio total y su distribución en tejidos de la media semilla de trigo, se realizó al medir la cantidad de calcio, por espectroscopía de absorción atómica, en las cenizas totales de las muestras bajo estudio (medias semillas, capas de aleurona y endospermos almidonosos).

Los resultados de calcio total, inicialmente en  $\mu\text{g/g}$  de tejido, se transformaron a  $\mu\text{g}$  de calcio total/región, empleando el dato de peso seco correspondiente, determinado según se describió en la sección III.3.5. (Materiales y Métodos).

El valor del peso seco calculado para la media semilla, representa el promedio del peso de 400 unidades, repartidas en 8 experimentos, mientras que el peso seco para los tejidos estudiados se obtuvo a partir de 4 experimentos, empleando lotes de 50 tejidos. Los resultados se presentan en la tabla IV.1.

En ella puede observarse que del peso total de la media semilla (29.5 mg), el 71% corresponde al endospermo almidonoso y el 22% a la capa de aleurona.

Por lo que respecta al calcio, se encontró que el 53% del calcio total de la media semilla (10.2  $\mu\text{g}$ ) se encuentra en la capa de aleurona, mientras que el calcio presente en el endospermo almidonoso, representa el 33% del total. Estos resultados indican que en la media semilla de trigo, la mayor proporción del calcio se encuentra en la capa de aleurona y el resto en el endospermo almidonoso.

La distribución de calcio para la media semilla de trigo determinada en este trabajo, es semejante a la reportada para el grano de cebada (Stewart y col., 1988), no así el nivel, ya que

TABLA IV.I NIVELES DE CALCIO TOTAL EN LOS TEJIDOS DE LA MEDIA SEMILLA DE TRIGO  
( *T. aestivum* ) VAR. TONICHI

	Peso <sup>a</sup> (mg/región)	calcio (mg/región)	calcio total <sup>a</sup> (µg/región)
Media semilla	29.5±1.1 (n=8)	0.3461±0.0165 (n=3)	10.21
Capa de aleurona	6.46±0.55 (n=4)	0.8699±0.115 (n=7)	5.62
Endospermo almidonoso	21.0±1.5 (n=4)	0.163±0.006 (n=5)	3.43

- <sup>a</sup>
- Los pesos de cada región se emplearon para expresar el calcio por región.
  - Los datos estan expresados en base seca.
  - las capas de aleurona y endospermos almidonosos se obtuvieron a partir de 50 medias semillas esterilizadas y embebidas.
  - El calcio se midió por espectroscopía de absorción atómica.

los autores encuentran que el endospermo almidonoso de cebada contiene menos del 50% de calcio ( $1.2\mu\text{g}$ ) que el determinado para trigo en este trabajo ( $3.4\mu\text{g}$ ).

#### IV.2 Efecto de la esterilización superficial e imbibición sobre el nivel de calcio de la media semilla.

En vista de que la recuperación del calcio total de la media semilla intacta ( $10.2\mu\text{g}$ ), calculada a partir del calcio de la capa de aleurona y el calcio del endospermo almidonoso, fué en promedio mayor del 80%, se procedió a determinar si durante la esterilización y/o imbibición de las medias semillas, se pudiera haber solubilizado alguna fracción de calcio que pudiera explicar el nivel de recuperación obtenido.

Con tal objetivo se midió el calcio en la solución de hipoclorito de sodio empleada después de la esterilización de las medias semillas y en el agua residual obtenida a partir del proceso de imbibición.

Los resultados se muestran en la tabla IV.2. En ella se observa que el calcio total de la media semilla después de esterilizarse y embeberse es igual a  $7.0\mu\text{g}$ , calculado por restar al calcio total de la media semilla intacta ( $10.2\mu\text{g}$ ), los valores de calcio encontrados para el agua de esterilización ( $1.46\mu\text{g}/\text{media semilla}$ ,  $0.15$ ,  $n=7$ ) y de imbibición ( $1.86\mu\text{g}/\text{media semilla}$ ,  $0.17$ ,  $n=7$ ). Este valor ( $7\mu\text{g}$ ), comparado con el que se obtiene con la media semilla intacta ( $10.2\mu\text{g}$ ), representa una diferencia aproximada del 20%, lo que señala a la esterilización e imbibición como las causas de la baja recuperación encontrada (80%).

#### IV.3 Origen del calcio empleado en la inducción de $\alpha$ -amilasa por capas de aleurona de trigo.

No obstante que nuestro resultado respecto a la distribución del calcio en la media semilla de trigo, establece que la capa de aleurona es la que contiene la mayor parte de este ion, no indica

TABLA IV.2 EFECTO DE LA ESTERILIZACION SUPERFICIAL E IMBIBICION SOBRE LA DISTRIBUCION DEL CALCIO DE LA MEDIA SEMILLA DE TRIGO (*T.aestivum* var. Tonichi).

	Calcio Total g/media semilla
-MEDIA SEMILLA SECA	10.2
- MEDIA SEMILLA SUPERFICIAL- MENTE ESTERILIZADA Y EMBEBIDA	7.0*
-CAPA DE ALEURONA	5.6
-ENDOSPERMO ALMIDONOSO	3.4

\*Este valor se obtuvo al restar el calcio medido en el agua de imbibición (1.86 g Ca<sup>2+</sup> por media semilla) y de esterilización (1.46 g Ca<sup>2+</sup> por media semilla), del calcio total de la media semilla seca.

de ningún modo, si del  $\text{Ca}^{2+}$  de esta región de la media semilla de trigo esta disponible y/o si es suficiente para el proceso de inducción de la  $\alpha$ -amilasa. Tampoco establece si el  $\text{Ca}^{2+}$  para la inducción proviene de otro(s) tejido(s) o si es el calcio de la capa de aleurona, el único que participa en la inducción de la enzima.

Por lo que tratando de responder la pregunta respecto así es el calcio de la capa de aleurona, el que participa en la inducción de  $\alpha$ -amilasa y si éste es suficiente para el proceso, se diseñó un experimento en el que se incubaron capas de aleurona, (obtenidas según la metodología descrita en la sección III.2.2) bajo los siguientes tratamientos:

- a) Ausencia de  $\text{GA}_3$  y calcio.
- b) Presencia de  $\text{GA}_3$  1 $\mu\text{M}$  y ausencia de calcio.
- c) Presencia de  $\text{GA}_3$  1 $\mu\text{M}$  y 20mM de calcio. Este tratamiento se empleó como un control.

Los tres tratamientos incluían 5mM de succinato y cloramfenicol y estreptomina a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . El pH de todos los tratamientos fue de 5.8.

Las condiciones de la incubación seguidas fueron las que se describieron en materiales y métodos, sección III.2.3.

Después de transcurrido el periodo de incubación (24 horas), se procedió a separar el medio de incubación, del tejido, midiendo en ambos la actividad de  $\alpha$ -amilasa, así como el calcio soluble.

Los resultados de este experimento se muestran en la figura IV.1.

En la región (a) de la gráfica se observa que la producción de la  $\alpha$ -amilasa requiere obligadamente la adición de  $\text{GA}_3$ , ya que no se detectó actividad enzimática en el medio de incubación, ni en el tejido, cuando la hormona no formaba parte de la composición del medio. Situación que contrasta con el resultado que se obtuvo al adicionar la hormona, pues según se observa en la región (b) de la gráfica, los niveles de la enzima se incrementan notablemente

tanto en el tejido como en el medio.

Al comparar los niveles de  $\alpha$ -amilasa que se obtienen cuando las capas de aleurona se incuban en un medio sin calcio (b) y cuando el medio contiene 20 mM de calcio además de  $GA_3$  (c), puede observarse, que los niveles de  $\alpha$ -amilasa detectados en el tejido, son similares entre sí para ambos tratamientos, no obstante que la composición del medio del tratamiento (b) no incluye calcio, por lo que se concluye que el calcio empleado para la inducción de la  $\alpha$ -amilasa debe ser el de la capa de aleurona y que además éste es suficiente para dar la misma respuesta en la producción de la enzima que el control con 20mM de  $CaCl_2$  (c).

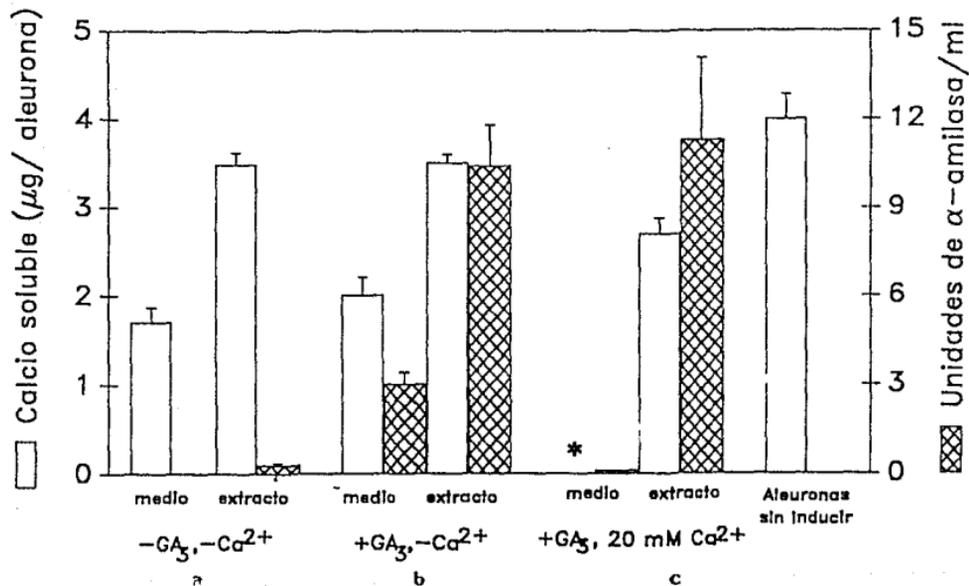
Respecto al bajo nivel de enzima secretado al medio cuando éste contiene 20mM de calcio, se puede decir que no obstante en trigo, la mayor proporción de la enzima permanece dentro del tejido, después de una incubación como la realizada en éste experimento, alrededor del 20% se libera al medio (Bernal, 1978), por lo que el resultado obtenido en la región (c), pudiera atribuirse a factores inherentes a la semilla o a factores metodológicos.

Los resultados sobre los niveles de calcio soluble medidos bajo las condiciones experimentales ya indicadas, muestran que:

1) la mayoría del calcio de capas de aleurona que no se han incubado, parece poder extraerse bajo las condiciones de la metodología indicada como "calcio soluble" (sección III.3.2), lo que indica que muy poco del calcio de la capa de aleurona debe estar enlazado a fitico, cuya solubilidad en agua a 2°C es muy baja (Jones, 1973).

2) No obstante que la mayoría del calcio de la capa de aleurona permanece en el tejido después del periodo de incubación, existe una fracción que se solubiliza bajo las condiciones de incubación (regiones a y b). En la región (c), el calcio solubilizado al medio no fue medido, aunque suponemos que éste debía estar cercano a 20mM.

Fig.IV-1 Origen del calcio para síntesis de  $\alpha$ -amilasa por capas de aleurona de trigo var Tonichi



El  $GA_3$  no parece influir en esta traslocación, ya que en su ausencia (a), el nivel de calcio es semejante al obtenido en (b), donde se incluye al  $GA_3$ .

Aunque se conoce que la liberación de iones como potasio, magnesio y fosfato de capas de aleurona de cebada es un proceso que depende de Acido giberélico (Jones, 1973), éste no parece tener efecto sobre la movilización de calcio (Eastwood y Laidman, 1971), según puede concluirse de observar las regiones (a) y (b) de la figura IV.1.

Sugiriendo tal resultado, que el calcio detectado en el medio, es solo una función de la agitación que se realiza durante la incubación y que por lo tanto constituye una fracción del calcio total de la capa de aleurona, la cual es relativamente soluble.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos indicados en esta sección y que se resumen en la figura IV.1, indican que el sistema de capas de aleurona de trigo es diferente al de capas de aleurona de cebada, respecto a los requerimientos de calcio para la inducción de  $\alpha$ -amilasa, pues mientras que éste último requiere de la adición exógena de iones  $Ca^{2+}$  a un nivel milimolar para observar la producción de la enzima, el sistema de trigo no lo requiere, ya que por sí solo es suficiente para producir el mismo nivel que se obtiene con 20mM de  $CaCl_2$  en 24 horas de incubación.

#### IV.4 Efecto de la eliminación del calcio de la capa de aleurona sobre la inducción de $\alpha$ -amilasa.

Los resultados hasta aquí obtenidos indican, que la capa de aleurona contiene el calcio suficiente para la inducción de  $\alpha$ -amilasa (figura IV.1), resultado que, no obstante permite descartar la aportación del calcio presente en el endospermo almidonoso, no responde nada respecto a la topografía de este calcio dentro de la capa de aleurona, ni cual es el nivel de

su participación en la inducción de  $\alpha$ -amilasa.

En relación al problema topográfico, los resultados con protoplastos de cebada indican que el calcio interno pudiera ser descartado, ya que inclusive en este sistema experimental, el calcio debe ser adicionado para observar la secreción de la enzima (Bush y Jones, 1988).

Por lo que con el objetivo inicial de establecer primero, el nivel de participación del calcio de la capa de aleurona que interviene en la inducción de  $\alpha$ -amilasa y basados en el hecho de que si durante el periodo que tarda la incubación del tejido, ésta se hace en presencia de EGTA, es posible extraer el calcio del tejido hasta un nivel en el que la producción de la enzima es nula (Rodríguez, 1989), se diseñó un experimento en el cual el tejido sería lavado por tiempos cortos (30 minutos) con EGTA 10mM pH 7.0, para que después de eliminado este, realizar la incubación con diferentes concentraciones de calcio, a manera de obtener la condición de lavado con la que se tuviera un nivel de actividad enzimática menor que el obtenido para el control. Por lo que si tal condición se diera, ésta representaría la fracción del calcio presente en el tejido, la cual efectivamente estaría participando en la inducción enzimática. El pH del medio de incubación fue 4.0.

Los resultados de este experimento se muestran en la tabla IV.3. En ella puede observarse que bajo ninguna condición de lavado (a y b), se logró disminuir el nivel de la enzima respecto al del control.

Lo anterior indica que, aunque el EGTA si extrae el calcio que toma parte en la inducción de  $\alpha$ -amilasa (Rodríguez, 1989), bajo las condiciones de nuestro experimento no fue posible afectar el nivel del calcio de la capa de aleurona que participa en la inducción de  $\alpha$ -amilasa, según se deduce al efectuar las comparaciones pertinentes entre los niveles de  $\alpha$ -amilasa obtenidos con el control y los tratamientos, los cuales incluyen, incubaciones a concentraciones mayores ó iguales a 0.0mM de calcio en el medio, después de los lavados con agua o EGTA.

TABLA IV.3 EFECTO DE LA ADICION DE EGTA SOBRE LA FORMACION DE  $\alpha$ -AMILASA.

Condición de lavado	[CaCl <sub>2</sub> ] durante la inducción				
	10 mM	1.0 mM	0.1 mM	0.01 mM	0.0 mM
	$\alpha$ -amilasa total (U/ml)				
a) EGTA 10 mM pH 7	11±1.5	9.9±1.5	11.9	11.4±1.15	9
b) H <sub>2</sub> O desionizada pH 7	10.1	12.0	11.0±1.3	11.2	10
c) Control <sup>m</sup>	10.4±1.8	12.0	10±2	11.2±2.2	10

<sup>m</sup> El resultado representa la actividad de capas de aleurona incubadas en 1  $\mu$ M de Ga<sub>3</sub> y CaCl<sub>2</sub> a la concentración indicada pero sin tratamiento de lavado.

El periodo de lavado fue de 30 min. después de lo cual se siguió la incubación por 24 h. a pH 4 en presencia de 1  $\mu$ M de Ga<sub>3</sub> y CaCl<sub>2</sub> a las concentraciones indicadas.

## CAPITULO V DISCUSION

Parte de la investigación que se esta realizando en plantas, tiene como punto central, analizar el papel del calcio en varios procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo de vegetales, debido al cada vez más creciente numero de procesos donde se ha evidenciado que éste participa (Hepler y Wayne, 1985).

En sistemas animales, es ampliamente reconocido que el calcio tiene un papel crucial en la secreción de varios péptidos (insulina,  $\alpha$ -amilasa).

En semillas, la inducción de  $\alpha$ -amilasa por ácido giberélico, constituye uno de los procesos de elección para estudiar el papel del calcio en la secreción de una enzima. De tal manera se ha llegado a establecer, no solo la participación del catión en la secreción de la  $\alpha$ -amilasa sino además que se requiere que este presente en el medio de incubación en un orden de concentración que oscila de 10 a 20mM para tener la saturación en la secreción de la enzima (Jones y Carbonell, 1984).

De los efectos que hasta el momento se sabe tiene el calcio externo sobre la secreción de la enzima, esta el de elevar la concentración de calcio citoplásmico (Bush y Jones, 1988).

Lo anterior ha llevado a la reconsideración de los reservorios de calcio externos a la célula de aleurona, como fuentes viables de aportar el nivel de calcio requerido en la secreción de la  $\alpha$ -amilasa.

De los pocos esfuerzos realizados para conocer la distribución de calcio en cereales se cuentan, el de Stewart y col., (1988) efectuado en el grano de cebada y otro hecho en avena (Tretyn y Kopcewicz, 1988). Mientras que de los efectuados con trigo, solo se pueden mencionar los realizados para estudiar la composición de los cuerpos proteicos (Ashton y Williams, 1958).

## NIVELES DE $Ca^{2+}$ Y SU DISTRIBUCION EN LOS TEJIDOS DE LA MEDIA SEMILLA DE TRIGO.

Los resultados obtenidos a este respecto establecen que en trigo al igual que en cebada, la principal reserva de calcio total dentro de la media semilla de trigo, se encuentra en la capa de aleurona (53%) (tabla IV.1), mientras que un 33% se encuentra en el endospermo almidonoso. Comparando estos resultados con los obtenidos en cebada, podemos decir que la tendencia en la distribución de calcio es cualitativamente semejante para ambos cereales, solo que el endospermo almidonoso de cebada, presenta menos de la mitad del calcio encontrado en trigo (1.2 $\mu$ g vs 3.4  $\mu$ g).

Al analizar la composición mineral de los cuerpos proteicos de la aleurona de cebada, Stewart y col., (1988) encuentra que de los minerales analizados (fósforo, potasio, magnesio y calcio), el calcio es el que se encuentra en más baja proporción. De repetirse tal situación en trigo, reforzaría a las reservas de calcio externas como proveedoras de éste elemento en la inducción de  $\alpha$ -amilasa.

## EFFECTO DE LA ESTERILIZACION SUPERFICIAL E IMBIBICION SOBRE EL NIVEL DE CALCIO DE LA MEDIA SEMILLA DE TRIGO.

De acuerdo con los resultados presentados en la tabla IV.2, no es posible establecer el origen del calcio perdido durante la esterilización e imbibición, aunque si es posible decir que después de la separación de la capa de aleurona del endospermo almidonoso, éste último contiene la menor proporción del calcio total de la media semilla y que alrededor del 20% del calcio total esta potencialmente libre, siendo factible su solubilización al través de estas etapas del proceso de obtención de las capas de aleurona.

Nuestro resultado sobre el calcio perdido durante la esterilización e imbibición (15-20%), contrasta con el 50% estimado por Stewart y col., (1988) en la semilla de cebada.

Aunque durante la imbibición hubo una pérdida ligeramente mayor (1.86 $\mu$ g de calcio/media semilla) que durante la esterilización (1.46 $\mu$ g de calcio/media semilla), esta diferencia no parece ser importante para ser considerada en la distribución del calcio de la media semilla.

Los resultados anteriores pueden ser explicados por el eflujo de minerales y otros metabolitos, que ocurre durante la imbibición de semillas, debido éste, posiblemente a una difusión pasiva por hidratación celular y/o a una liberación y difusión del contenido de células muertas o rotas presentes en la superficie del tejido (Duke y col. 1983 y Bewley y Black, 1983).

#### ORIGEN DEL CALCIO EMPLEADO EN LA INDUCCION DE $\alpha$ -AMILASA POR CAPAS DE ALEURONA.

El hecho de que el sistema de capas de aleurona de trigo no requiera de una adición extra de calcio para la inducción de  $\alpha$ -amilasa, como se ha hecho evidente en el sistema de capas de aleurona de cebada, hace al primero diferente en cuanto a éste requerimiento, ya que según nuestros resultados, la capa de aleurona de trigo no lo requiere.

No obstante, queda pendiente por estudiar si el calcio de la capa de aleurona de trigo es suficiente para permitir la síntesis de los dos grupos de isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa, ya que según se ha mostrado en cebada, la concentración de calcio en el medio de incubación, tiene un efecto marcado en la síntesis y secreción de las isoenzimas de PI alto (Jones y Carbonell, 1984), siendo factible que, pues aunque se haya obtenido que el calcio de la capa de aleurona de trigo produce niveles de  $\alpha$ -amilasa semejantes inclusive a los del control con 20mM de calcio (datos no mostrados) es posible que este calcio no fuera suficiente para la síntesis de todas las isoenzimas o en otro caso, que el calcio de la capa de aleurona sí fuera suficiente para la síntesis, pero no para la secreción de todas las isoenzimas..

Por isoelectroenfoque, sería posible determinar,

especialmente, para el caso donde no se adicionó calcio (fig. IV.1, tratamiento b), si el calcio presente en la capa de aleurona fue suficiente para la síntesis de todas las isoenzimas que se han aislado de la capa de aleurona de trigo.

Paralelamente con esta determinación se podría confirmar, si el nivel de  $\alpha$ -amilasa observado con el control (región c, de la figura IV.1), (el cual es ligeramente más alto que el obtenido cuando no se pone calcio (b)), se debe a la síntesis de alguna isoenzima adicional a las formadas cuando no se pone calcio, cuyo nivel de actividad no se pueda discernir concluyentemente con el ensayo enzimático, o si el incremento observado en el nivel de  $\alpha$ -amilasa es parte de la variación experimental observada.

#### EFFECTO DE LA ELIMINACION DEL CALCIO DE LA CAPA DE ALEURONA SOBRE LA INDUCCION DE $\alpha$ -AMILASA.

Aunque los estudios relacionados con giberelinas, auxinas y citocininas se realizan empleando de 0.1mM a 10mM de calcio en el exterior, tal situación no deja de ser curiosa, ya que ésta es una concentración muy superior a la que realmente se utiliza en los procesos donde estas hormonas participan. Por ejemplo, en el caso de la producción de  $\alpha$ -amilasa, la célula requiere incrementar su calcio intracelular de 250nM a 350nM, para observar la secreción de la enzima.

Con base en lo anterior se pensó que tal vez no todo el calcio de la capa de aleurona era necesario para la inducción y que solo una fracción de éste participará en el proceso.

Los niveles de  $\alpha$ -amilasa obtenidos mediante lavados de las capas de aleurona con EGTA o agua a pH 7, no afectaron el nivel de la actividad enzimática de  $\alpha$ -amilasa, en comparación con el control, lo que parece sugerir que la inducción de  $\alpha$ -amilasa requiere bajos niveles de calcio, pues a pesar de utilizar un quelante fuerte para calcio, no se afectaron los niveles en la enzima en comparación con el control, o que bien, debido a la fuerte capacidad amortiguadora ejercida por la pared (Demarty y

col., 1984) no haya sido posible extraer el calcio de la célula.

Esta última sugerencia parece contraponerse con el resultado del experimento de la sección IV.3. en él que se observa que a pH 5.8, una buena parte del calcio de la capa de aleurona pasa al medio de incubación, pero debe recordarse que en éste último caso el tejido se agita por 24 horas en un amortiguador de succinato, mientras que en los experimentos de lavados, estos se realizan por 30 minutos, con EGTA o agua, como únicas soluciones extractoras.

Para comprobar la validez de cualquiera de las dos sugerencias propuestas, y no obstante estar establecida la capacidad del EGTA para quelar calcio (Scharzenbach y Flashka, 1969), queda pendiente medir en la solución de EGTA, el calcio extraído durante el período de lavado.

Aunque el EGTA ha sido empleado como una herramienta en la resolución del problema que concierne al papel del calcio presente en la pared celular, éste enfoque experimental se ha topado con varios problemas, uno de ellos relacionado con el posible daño celular, que se causa al eliminar el calcio de la pared, al que se le adjudica, entre otras funciones, un papel en la conservación de la estabilidad de los sistemas de transporte presentes en la membrana celular (Ferguson y Drobak, 1988). En nuestro caso, los lavados con EGTA no parecieron afectar, ya que bajo ninguna condición donde éste empleo, se afectó el nivel de la enzima en comparación con el control.

## VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

No obstante ser evidente, que el calcio participa en la respuesta de secreción inducida por el  $GA_3$ , una gran parte del trabajo permanece por ser realizado. Por fortuna, el sistema de capas de aleurona proporciona un sistema adecuado para estudiar el efecto, que calcio y  $GA_3$  tienen sobre la inducción de los dos grupos de isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa.

Como se ha mencionado, en cebada las isoenzimas de pI alto requieren además de la hormona, de la adición al medio de incubación, de 0.5mM de  $CaCl_2$ , y que este grupo aparece hasta las 13 horas de incubación con  $GA_3$  y calcio, mientras que las de pI bajo lo hacen desde las 8 horas, independientemente de la presencia de calcio en el medio (Jacobsen y Higgins, 1982).

No obstante desconocer si en trigo, la inducción de  $\alpha$ -amilasa tiene una dependencia de calcio, se sabe que los transcritos de  $\alpha$ -Amy1 se acumulan paralelamente con otros genes regulados también por  $GA_3$ , a los dos días de incubación con la hormona, mientras que la acumulación de los mensajeros de  $\alpha$ -Amy2 se presenta 48 horas más tarde (Baulcombe y col. 1984), por lo que sería interesante estudiar si el calcio tiene algún efecto regulatorio en esta cinética.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, los cuales muestran que el sistema de capas de aleurona de trigo no requiere de la adición extra de calcio al medio de incubación, ya que el calcio presente en este sistema fue suficiente para dar niveles similares a los del control con 20mM, resulta interesante investigar, si el calcio de la capa de aleurona tiene alguna influencia sobre la expresión genética de los genes para  $\alpha$ -amilasa, mediante el empleo de técnicas ya conocidas como isoelectrofoque y medición de los niveles de los mensajeros para  $\alpha$ -amilasa.

Basados en el resultado de este trabajo, respecto a la distribución de calcio en la media semilla de trigo, el cual indica que la capa de aleurona posee la mayor proporción del calcio total (5.6  $\mu\text{g}$ ) y otra menor se encuentra en el endospermo almidonoso (3.4  $\mu\text{g}$ ), es conveniente que, paralelamente con el empleo del EGTA para extraer el calcio del tejido, se realicen análisis por microscopía de fluorescencia, con el objetivo de localizar la región de la capa de aleurona, donde se encuentra el calcio que participa en la producción de  $\alpha$ -amilasa, mediada por  $\text{GA}_3$ .

Finalmente, otro aspecto interesante por investigar, lo constituye el posible efecto que pudiera tener el pH sobre la solubilización del calcio de la semilla, ya que se conoce que durante la imbibición, sucede una acidificación del medio externo (Mikola y Virtanen, 1981). Hamabata y col (1988) reportan que el calcio del endospermo de la semilla de trigo se solubiliza más, a medida que disminuye el pH. De tal manera que si consideramos que el calcio está enlazado dentro de la pared a grupos cargados negativamente, este puede ser liberado por una disminución en el pH del medio externo, dando lugar a la solubilización, tanto del calcio de la pared como al presente en el endospermo almidonoso.

## VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1 ABELES, F.B.; LONSKY, J. 1969. Stimulation of lettuce seed germination by ethylene. *Plant Physiol.* 44:277.
- 2 AINSWORTH, C.C.; DOHERTY, P.; EDWARDS, F.G.K.; MARTIENSSSEN, R.A.; GALE, M.D., 1985. Allelic variation at  $\alpha$ -amilase loci in hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 70:400
- 3 AKASAWA, T.; NISHIMURA, I.H. 1985. Topographic aspects of biosynthesis extracellular secretion and intracellular storage of proteins in plant cells. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36:441-472.
- 4 ASHTON, W.M.; WILLIAMS, P.C. 1958. The phosphorous compound of oat. I. The content of phytate of phosphorous. *J. Sci. Food. Agri.* 9:505-511.
- 5 ATZORN, R.; WEILER, E.W. 1983. The role of endogenous gibberellins in the formation of  $\alpha$ -amylase by the aleurone layers of germinating barley caryopses. *Planta* 159:289-299.
- 6 BACIC, A.; STONE, B.A. 1981. Chemistry and organization of aleurone cell wall components from wheat and barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 8:475-495
- 7 BAULCOMBE, D.C.; BUFFARD, D. 1983. Gibberellic acid-regulated expression of  $\alpha$ -amylase and six other genes in wheat aleurone layers. *Planta* 157:493-501.
- 8 BAULCOMBE, D.; LAZARUS, C.; MARTIENSSSEN, R. 1984. Gibberellin and gene control in cereal aleurone cells. *J. Embryol. Exp. Morph.* 83 Supplement:119-135.
- 9 BERNAL-LUGO, I. 1978. Efecto postranscripcional del Acido giberélico en capa de aleurona de trigo. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.

- 10 BERNAL-LUGO, I.; BEACHY, R.N.; VARNER, J.E. 1981. The response of barley aleurone layers to gibberellic acid includes the transcription of new sequences. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 102:617-623.
- 11 BEWLEY, J.D.; BLACK, M. 1983. *Physiology and Biochemistry of seeds.* Springer-Verlag. 306pp.
- 12 BIANCHETTI, R.; Sartivana, M.L. 1967. The mechanism of the repression by inorganic phosphate of phytase synthesis in the germinating wheat embryo. *Biochem. Biophys. Acta.* 145:485-490.
- 13 BRIGGS, D.E. 1967. Modified assay for  $\alpha$ -amylase in germinating barley. *J. Inst. Brew.* 73:361-369.
- 14 BUSH, D.S.; CORNEJO, M.-J.; HUANG, C.-N.; JONES, R.L. 1986. Calcium-stimulated of  $\alpha$ -amylase during development of barley aleurone protoplasts. *Plant Physiol.* 82:566-574.
- 15 BUSH, S.D.; JONES, R.L. 1988. Cytoplasmic calcium and  $\alpha$ -amylase secretion from barley aleurone protoplasts. *Eur. J. Cell Biol.* 46:466-469.
- 16 CHRISPPELS, M.J.; VARNER, J.E. 1967. Gibberellic acid-enhanced synthesis and release of  $\alpha$ -amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 42:398-406.
- 17 DAVEY, J.E.; VAN STADEN, J. 1979. Cytocinin activity in *Lupinus albus* L. IV: Distribution in seeds. *Plant Physiol.* 63:873-877.
- 18 DEIKMAN, J.; JONES, R.L. 1985. Control of  $\alpha$ -amylase mRNA accumulation by gibberellic acid and calcium in barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 78:192-198.
- 19 DEMARTY, M.; MORVAN, C.; THELLIER, M. 1984. Calcium and the cell wall. *Plant cell and environment.* 7:441-448.

- 20 DUKE, S.H.; KAKEFUDA, G.; HARVEY, T.M. 1983. Differential leakage of intracellular substances from imbibing soybeans seed. *Plant Physiol.* 72:919-924.
- 21 EASTWOOD, D.; D.L.LAIDMAN. 1971. The mobilization of macronutrient element in the germinating wheat grain. *Phytochemistry* 10:1275-1284.
- 22 ESAU, K. 1977. *Anatomy of seed plants. Segunda edición.* John Wiley and Sons. 436pp.
- 23 EVINS, W.H. 1971. Enhancement of polyribosome formation and induction of tryptophan rich proteins by gibberellic acid. *Biochemistry* 10:4295-4303.
- 24 FAHN, A. 1977. *Plant Anatomy. Segunda ed.* Pergamon press. New York. 547pp.
- 25 FERGUSON, I.B.; DROBAK, B.K. 1980. Calcium and the regulation of plant growth and senescence. *Hortscience* 23(2):262-266.
- 26 FILNER, P.; VARNER, J.E. 1967. A test for the *in vivo* synthesis of enzymes: density labeling with  $H_2O^{18}$  of barley  $\alpha$ -amylase induced by gibberellic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56:1520-1526.
- 27 FINCHER, G. 1989. Molecular and Cellular Biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grain. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol Biol.* 40:305.
- 28 FLINTHAM, J.E.; GALE, M.D. 1988. Genetics of pre-harvest sprouting and associated traits in wheat review. *Plant Varieties and seeds* 1:87-97.
- 29 GALSON, E.; TINELLI, E.; WALTON, D. 1974. The metabolism of hormones during seed germinating and dormancy. IV. The metabolism of (S)-2- $^{14}C$  Abscisic acid in ash seed. *Plant Physiol.* 54:803.

- 30 GIBBONS, G.C. 1981. On the relative role of the scutellum and aleurone in the production of hydrolases during germination of barley. *Carlsberg Res. Commun.* 46:215.
- 31 GUBLER, F.; JACOBSEN, J.V.; ASHFORD, A.E. 1986. Involvement of the Golgi apparatus in the secretion of  $\alpha$ -amylase from gibberellin-treated barley aleurone cells. *Planta* 168:447-452.
- 32 HALL, R.H.; CONDA, L.; DAVID, H.; MCLENNON, B. 1975. Cytokinins in the soluble RNA of plant tissues. *Science* 156:69-71.
- 33 HAMABATA, A.; GARCIA-MAYA, M.; ROMERO, T.; BERNAL-LUCO, I. 1988. Kinetics of the acidification capacity of aleurone layer and its effect upon solubilization of reserve substances from starchy endosperm of wheat. *Plant Physiol.* 86:643-644.
- 34 HARDIE, D.G. 1975. Control of carbohydratase formation by gibberellic acid in barley endosperm. *Phytochemistry* 14:1719-1722.
- 35 HEIDECKER, G.; NESSING, J. 1986. Structural analysis of plant genes. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 37:439-466.
- 36 HEPLER, K.P.; WAYNE, O.R. 1985. Calcium and plant development. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 36:397-439.
- 37 HIGGINS, T.J.V.; ZWAR, J.A.; JACOBSEN, J.V. 1976. Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for  $\alpha$ -amylase in barley aleurone layers. *Nature* 260(11):166-169.
- 38 HO, T.H.D.; VARNER, J.E. 1974. Hormonal control of messenger ribonucleic acid metabolism in barley aleurone layers. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 71:4783-4785.
- 39 JACOBSEN, J.V.; HIGGINS, T.J.V. 1982. Characterization of the  $\alpha$ -amylases synthesized by aleurone layers of Himalaya barley in response to gibberellic acid. *Plant Physiol.* 70:1647-653.

- 40 JONES, R.L. 1968. Ethylene enhanced release of  $\alpha$ -amylase from barley aleurone cell. *Plant Physiol.* 43:442-444.
- 41 JONES, R.L. 1969. Gibberellic acid and the fine structure of barley aleurone cells I. Changes during the lag-phase of  $\alpha$ -amylase synthesis. *Planta* 87:119-133.
- 42 JONES, R.L. 1973. Gibberellic acid and ion release from barley aleurone tissue. *Plant Physiol.* 52:303.
- 43 JONES, R.L.; ARMSTRONG, J.E. 1971. Evidence for osmotic regulation of hydrolytic enzyme production in germinating barley seeds. *Plant Physiol.* 48:137-142.
- 44 JONES, R.L.; CARBONELL, J. 1984. Regulation of synthesis of barley aleurone  $\alpha$ -amylase by gibberellic acid and calcium ions. *Plant Physiol.* 76:213-218.
- 45 JONES, R.L.; JACOBSEN, J.V. 1983. Calcium regulation of the secretion of  $\alpha$ -amylase isoenzymes and other proteins from barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 158:1-9.
- 46 KHAN, A.A. 1982. The physiology and biochemistry of seed development dormancy and germination. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam. 546pp.
- 47 LANG, A. 1970. Gibberellins: Structure and metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 21:597.
- 48 LAU, O.L.; YANG, S.F. 1975. Interaction of kinetin and calcium in relation to their effect on stimulation of ethylene production. *Plant Physiol.* 55:7388.
- 49 LAZARUS, C.M.; BAULCOMBE, D.C.; MARTIENSSEN, R. 1985. Alpha-amylase genes of wheat are two multigene families with are differentially expressed. *Plant Mol. Biol.* 5:13-24.
- 50 MAYER, A.M.; POLJAKOFF, M.A. 1975. The germination of seeds

- 51 McMILLAN, J.; TAKAHASHI, N. 1968. Proposed for allocation of trivial names to the gibberellins. *Nature* 217:170-171.
- 52 MIKOLA, J.; VIRTANEN, M. 1981. Regulation of pH in the starchy endosperm of barley grain during reserve protein. *Abhdlg. Akad. Wiss. Ddr. Abt. Math. Naturwiss., Tech.* 5N:257-258.
- 53 MILBORROW, B.V. 1974. The Chemistry and Physiology of abscisic acid. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25:259-307.
- 54 MILLER, C.O. 1958. The relationship of the kinetin and red-light promotions of lettuce. *Plant Physiol.* 33:115.
- 55 MITSUI, T.; CHRISTELLER, J.T.; H-NISHIMURA, I.; AKASAWA, T. 1984. Possible roles of calcium and Calmodulin in the biosynthesis and secretion of  $\alpha$ -amylase in rice seeds scutelar epithelium. *Plant Physiol.* 75:21-25.
- 56 MIYATA, S.; AKASAWA, T. 1982. Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. (12) Biosynthesis of  $\alpha$ -amylase in relation to protein glycosylation. *Plant Physiol.* 70:147-153.
- 57 MOLL, B.A.; JONES, R.L. 1982.  $\alpha$ -amylase secretion by single barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 70:1149-1155.
- 58 NICHOLLS, P.B. 1967. The isolation of indol-3-acetyl -2-O-myo-inositol from Zea mays. *Planta* 72:258-264.
- 59 NISHIKAWA, K.; NOBUHARA, M. 1971. Genetic studies of  $\alpha$ -amylase isozymes in wheat I. Location of genes and variation in tetra- and hexaploid wheat. *Japan J. Genetics.* 46:343-353.
- 60 OHKUMA, K.; LYON, J.L.; ADDICOTT, F.T.; SMITH, O.E. 1963. Abscisin II, an abscission accelerating substance from young

- cotton fruit. Science 142:1592.
- 61 PISKORNIK, Z.; BANDURSKI, R.S. 1972. Purification and partial characterization of a glucan containing indole-3-acetic acid. Plant Physiol. 50:176-182.
- 62 POLLARD, C.J. 1969. A survey of the sequence of some effects of gibberellic acid in the metabolism of cereal grains. Plant Physiol. 44:1227.
- 63 RADLEY, M. 1967. Site of production of gibberellin-like substances in germinating barley embryos. Planta 75:164-171.
- 64 RODRIGUEZ, E. 1989. La capacidad de acidificación de las capas de aleurona de trigo en relación con la inducción de  $\alpha$ -amilasa con ácido giberélico. Trabajo pre-doctoral. Departamento de Bioquímica, CINVESTAV-IPN.
- 65 ROGERS, J.C.; MILLIMAN, C. 1983. Isolation and sequence analysis of barley  $\alpha$ -amylase cDNA clone. J. Biol. Chem. 258:8169-8174.
- 66 SCHNEIDER, E.; WEGHTMAN, F. 1974. Metabolism of auxins in higher plants. Ann.Rev.Plant Physiol. 25:487-513.
- 67 SCHWARZENBACH, G.; FLASHKA, H. 1969. Complexometric titrations. Methuen Co. London.
- 68 SHANTZ, E.M.; STEWART, F.C. 1957. The growth stimulating substances in extracts of immature corn grain:A progress report. Plant Physiol. 32 supplement:vii.
- 69 STEWART, A.; WEILD, H.; LOTT, J.N.A. 1988. An investigation of the mineral content of barley grains and seedling. Plant Physiol. 86:93.

- 70 SWAIN, R.R.; DEKKER, E.E. 1966. Seed germination studies II. Pathways for starch degradation in germinating pea seedlings. *Biophys. Biochim. Acta* 122:87.
- 71 TRETYN, A.; KOPCEWICZ, J. 1988. Calcium localization in oat aleurone cells using chlorotetracycline and X-Ray microanalysis. *Planta* 175:237-240.
- 72 TREWAVAS, A.J. 1982. Growth substances: The limiting factor in plant development. *Physiol. Plant.* 55:60-72.
- 73 TRONIER, B.; ORY, R.L.; HENNINGSEN, K.W. 1971. Characterization of the fine structure and proteins from barley protein bodies. *Phytochemistry* 10:1207-1211.
- 74 UEDA, M.; EHMAN, A.; BANDURSKY, R.S. 1970. Gas-liquid chromatographic analysis of indole-3-acetic acid myo inositol esters in maize kernels. *Plant Physiol.* 46:715-719.
- 75 VARNER, J.E.; R.M. MENSE 1972. Characteristics of the process of enzyme release from secretory plant cells. *Plant Physiol* 49:187-189.
- 76 YOMO, H.; VARNER, J.E. 1971. Hormonal control of a secretory tissues. *Currents topics in developmental Biol.* 6:111-144.