

8 2e)



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**INFLUENCIA DEL ACIDO GIBERELICO EN LOS
NIVELES DE POLIAMINAS EN CAPA DE
ALEURONA DE CEBADA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

Q U I M I C O

P R E S E N T A :

ARACELI ESTRADA MENA



MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN

I.-	INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	3
I.1	POLIAMINAS	4
I.1.1	ESTRUCTURA Y DISTRIBUCION DE POLIAMINAS EN PLANTAS	4
I.1.2	EFFECTO DE POLIAMINAS EN LA SINTESIS DE MACROMOLECULAS	6
I.1.3	EFFECTO DE POLIAMINAS EN LA ESTRUCTURA DE AC. NUCLEICOS Y PROTEINAS	7
I.1.4	CAMBIO EN LOS NIVELES DE POLIAMINAS EN DIVERSAS ETAPAS DEL DESARROLLO DE PLANTAS	8
I.1.5	EFFECTO DE POLIAMINAS EN RESERVAS	10
I.1.6	POLIAMINAS Y FITOREGULADORES	10
I.2	ESTRUCTURA DEL GRANO DE CEREALES	12
I.2.1	ENDOSPERMA	12
I.2.2	EMBRION	14
I.2.3	COMPOSICION Y DISTRIBUCION QUIMICA DE LA SEMILLA DE CEREALES	14
I.3	PROCESO DE GERMINACION	14
I.4	MOVILIZACION DE CARBOHIDRATOS	15
I.5	CONTROL HORMONAL EN LA MOVILIZACION DE RESERVAS	16
I.6	REGULACION DEL METABOLISMO DE LA ALBUMINA POR AG_3	19
I.7	MECANISMO DE ACCION DEL AG_3 EN LA BIOSINTESIS DE ALFA AMILASA EN ALBUMINA	19
I.8	PAPEL DEL CALCIO EN ACTIVIDAD Y TRANSPORTE DE ALFA AMILASA	23
	OBJETIVOS	26
II.-	MATERIAL Y METODOS	27
II.1	MATERIAL-BIOLÓGICO	27
II.2	MATERIAL DE VIDRIO	27
II.3	APARATOS	27

II.4	REACTIVOS	28
II.5	DESINFECCION DE MEDIAS SEMILLAS Y ESTERILIZACION DE MATERIAL	28
II.6	INOCULACION DE LAS MEDIAS SEMILLAS	28
II.7	AISLAMIENTO DE LAS CAPAS DE ALEURONAS	28
II.8	TRATAMIENTO DE LAS CAPAS DE ALEURONA CON FITORREGLADORES	29
II.9	DETERMINACION DE POLIAMINAS LIBRES EN CAPA DE ALEURONA	29
II.9.1	EXTRACCION DE POLIAMINAS LIBRES EN TEJIDO DE ALGUNA SEMILLA	29
II.9.2	DANSILACION Y CUANTIFICACION DE POLIAMINAS	32
II.9.2.1	METODO PARA LA SINTESIS DE LOS DERIVADOS DANSILADOS DE POLIAMINAS	32
III.-	RESULTADOS	48
III.1	EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION DEL TEJIDO SOBRE LOS NIVELES DE POLIAMINAS	48
III.2	EFFECTO DE Ag_3 EN LOS NIVELES DE POLIAMINAS EN CAPA DE ALEURONA DE CEREA	48
III.3	NIVELES DE POLIAMINAS EN ALEURONAS AISLADAS DE SEMILLAS DETERIORADAS	49
III.4	EFFECTO DE Ag_3 EN LOS NIVELES DE POLIAMINAS EN ALEURONAS DETERIORADAS	54
III.5	EFFECTO DE ASA EN LOS NIVELES DE POLIAMINAS EN ALEURONAS	54
IV.-	DISCUSION Y CONCLUSIONES	60
V.-	PERSPECTIVAS	66
VI.-	BIBLIOGRAFIA	67

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA		PAG
1	ESTRUCTURA DE POLIAMINAS	5
2	CORTE LONGITUDINAL DEL GRANO DE TRIGO	13
3	REACCIONES ESTIMATICAS DE DEGRADACION DE AMIDON	18
4	PRODUCCION DE ALFA AMILASA EN RESPUESTA A AG_3	21
2.1	AISLAMIENTO DE CAPAS DE ALBUONA	30
2.2	TRATAMIENTO DE LAS CAPAS DE ALBUONA CON FITOSOLADONES	31
2.3	DETERMINACION DE MICROLITROS DE EXTRACTO PARA EL METODO DE DANSELACION	33
2.4	CURVA DE ESTABILIDAD DE COMPUESTOS DANSELADOS	35
2.5	PATRON DE ELECCION DE POLIAMINAS	36
2.6	DIAGRAMA DE EXTRACCION Y ENSAYO DE POLIAMINAS	38
2.7	CURVA PATRON DE PUT-Dans	39
2.8	CURVA PATRON DE SFD-Dans	40
2.9	CURVA PATRON DE SFD-Dans	41
2.10	CURVA PATRON DE PUT-Dans	42
2.11	CURVA PATRON DE SFD-Dans	43
2.12	CURVA PATRON DE SFD-Dans	44
2.13	VERIFICACION DE ACTIVIDAD DE ALFA AMILASA	46
3.1	ESECTO DEL TIEMPO DE INOCUACION EN LOS NIVELES DE POLIAMINAS EN ALBUONAS CONTROL	50
3.2	ESECTO DE AG_3 EN LOS NIVELES DE POLIAMINAS EN ALBUONAS CONTROL	51
3.3	RELACION-ESECTO DEL AG_3 EN LOS NIVELES DE POLIAMINAS EN ALBUONAS CONTROL	52
3.4	ESECTO DE AG_3 EN LA PRODUCCION DE ALFA AMILASA	53
3.5	NIVELES DE POLIAMINAS EN ALBUONAS DE SEMILLAS DETERICADAS	55

3.6	EFFECTO DE As_3 EN LOS NIVELES DE POLIAMINAS EN ALGEBRONAS DETERIORADAS	56
3.7	EFFECTO DE As_4 EN LOS NIVELES DE PUT EN ALGEBRONAS DETERIORADAS	57
3.8	EFFECTO DE As_4 EN LOS NIVELES DE BPO Y SPW EN ALGEBRONAS DETERIORADAS	59
4.1	RESULTADOS EXPERIMENTALES DE DOS INDOCCIONES DIFERENTES UTILIZANDO UN MISMO SISTEMA	64

ABREVIATURAS:

AG ₃	Acido Giberélico
ABA	Acido Abscísico
PAS	Foliaminas
Put	Putrescina
Spd	Spermidina
Spc	Spermina
ARN	Acido Ribonucleico
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADC	Enzima Arginina Descarboxilasa
ODC	Enzima Ornitina Descarboxilasa
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
Ca ²⁺	Ion Calcio
IAA	Acido Indol acético
MEM	Retículo endoplásmico Rugoso
HNO ₃	Acido Nítrico
HNO ₂	Acido Nítrico
KNO ₃	Cloruro de Potasio
NaCl	Cloruro de Sodio
I ₂ /KI	Yodo-Yoduro de Potasio
nanomoles	nanomoles; 10 ⁻⁹ moles
MSBG	Metilglicoxil-bis-(guanilhidrazona)
DFMA	Difluorometilarginina
DFMO	Difluorometilornitina
RNAs	ribonucleos
SADDC	S-adenosilmetionina Descarboxilasa
PAC	Foliamina Oxidasa
Ca ²⁺	Calciferina
2,4-D	2,4-Diclorofenoxi acético ácido.

" Nada tan rico como el inagotable caudal
de la naturaleza.
Tan solo nos muestra superficies,
pero su profundidad es de un millón de
brazos. "

Ralph Waldo Emerson

RESUMEN

La síntesis y acumulación de poliaminas aumenta concomitantemente a procesos regulados por fitorreguladores (elongación, diferenciación, germinación, senescencia, estrés, etc) ó por la adición exógena de estos a tejidos sensibles. Los resultados anteriores han sugerido que las poliaminas podrían actuar como mediadores ó "segundos mensajeros" en la acción de fitorreguladores. Sin embargo, los sistemas biológicos empleados para los estudios anteriores tienen el inconveniente de no estar bioquímicamente definidos por lo que no es posible hacer conclusiones definitivas.

El efecto del ácido giberélico en la capa de aleurona está bien caracterizado desde el punto de vista bioquímico. En cebada este fitorregulador regula la expresión de los genes de alfa-amilasa tanto a nivel de transcripción como de traducción. Este sistema fue empleado en el presente trabajo con la finalidad de estudiar la acción del ácido giberélico estando involucradas las poliaminas. Para demostrar lo anterior se estudiaron los niveles de poliaminas durante la síntesis de alfa amilasa inducida por ácido giberélico en dos lotes de aleuronas, uno denominado control y otro deteriorado. Las poliaminas se cuantificaron por el método de densitometría.

La incubación del tejido en solución también modifica los niveles de poliaminas tanto en aleuronas control como en deterioradas. En el primer lote las poliaminas aumentan en forma transitoria durante las dos primeras horas de incubación, mientras que en el lote deteriorado sólo la putrescina sufre tal efecto. El ácido giberélico no modifica los niveles de putrescina en las aleuronas control, pero los disminuye ligeramente en aleuronas deterioradas. Por su parte los niveles de espermidina y espermina no se modifican por la adición de ácido giberélico en el lote de aleuronas deterioradas, pero en las control la espermidina aumenta en forma transitoria durante las primeras dos horas y los niveles de espermina presenta dos máximos, uno a las dos horas de tratamiento y otro a las 18 h.

La incapacidad de las células detritadas para mantener los niveles de putrescina en presencia de ácido giberélico e inducir los aumentos transitorios de espermidina y espermina, correlacionan con la menor actividad de alfa amilasa que el fitoregulador induce en este lote.

Los datos obtenidos muestran que el ácido giberélico modifica los niveles de poliaminas al mismo tiempo que induce la síntesis de alfa amilasa. La cantidad de actividad de enzima inducida depende de los cambios en espermidina y espermina que el tejido experimenta por acción del ácido giberélico.

" No debo buscar mi dignidad en el espacio,
sino en el gobierno de mi pensamiento.
No tendré más nunca peses nuevos.
Si fuera por el espacio, el universo
me rodearía y se me tragaría como un átomo;
pero por el pensamiento
Yo abrazo el mundo. "

Blaize Pascal, Pensées

"Lo conocido es finito, lo desconocido infinito:
desde el punto de vista intelectual estamos en
una pequeña isla en medio de un océano ilimitable
de inexplicabilidad.
Nuestra tarea en cada generación es recuperar
algo más de tierra. "

T.H.Murley, 1987

I.- INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

En plantas al igual que en otros sistemas biológicos las poliaminas están involucradas en la estabilidad, biosíntesis, estructura y función de ácidos nucleicos, estabilidad membranar, síntesis de proteínas (1,2,3,4,5).

¿ por qué fisiológico estas moléculas se protonan funcionando como polielectrolitos y dadas sus características anfipáticas pueden interactuar en sitios de constante dieléctrica de tal manera que un catión inorgánico no penetraría (2).

A la fecha no se conoce con precisión el mecanismo molecular por medio del cual estas moléculas realizan su función fisiológica. En plantas se ha establecido que su síntesis y acumulación está estrechamente asociada con (2,4,6,7,8,9):

- a) Crecimiento y desarrollo: elongación, diferenciación, germinación.
- b) Senescencia
- c) Estrés.

Estos fenómenos se regulan en mayor o menor medida por fitohormonas reguladoras, en el primero se encuentran involucrados auxinas, giberelinas y citoquininas; En el segundo, etileno y para algunos tipos de estrés el ácido abscísico (ABA)

El hecho que la síntesis y acumulación de poliaminas aumente concurrentemente a los procesos regulados por fitoreguladores o por la acción de los mismos (4,8,10,11) sugiere que las poliaminas pueden funcionar como mediadores o "segundos mensajeros" en la acción de estos (2).

Para determinar si las poliaminas actúan como segundos mensajeros es necesario contar con un sistema en el cual la respuesta al fitoregulador este caracterizada desde un punto de vista bioquímico. Las evidencias que se tienen hasta la fecha se han obtenido de estudios realizados durante el crecimiento y diferenciación de diversos tejidos. Estos procesos van acompañados de división y/o elongación celular, expresión o represión de varios genes y por cambios en el metabolismo intermediario del tejido en estudio.

La anterior base que si bien es cierto que hay cambios en la síntesis y niveles de poliaminas durante el crecimiento y diferenciación celular no se pueda determinar con certeza si estos cambios son inducidos por el fitorregulador o si son consecuencia de los eventos fisiológicos que el fitorregulador induce.

Considerando lo anterior y tratando de esclarecer el papel de las poliaminas en sistemas vegetales, es necesario escoger un sistema en el cual la respuesta al fitorregulador este bien caracterizada y se conozcan los eventos moleculares que la acompañan.

Un sistema que reúne tales características es la capa de aleurona, el fitorregulador al que responde es el de. giberélico (AG_3) y la respuesta bioquímica, bien caracterizada, es la síntesis de α -alfa amilasa.

Continuación, con el fin de entender mejor estos sistemas se expone de manera más amplia lo siguiente:

El papel de las poliaminas en sistemas vivos vegetales y características del sistema de aleurona, en semillas de cebada, la respuesta bioquímica que excita el AG_3 en este sistema y que conlleva a la síntesis de α -amilasa.

1.1 POLIAMINAS

1.1.1 Estructura y distribución de Poliaminas en plantas:

Las poliaminas más estudiadas tanto en procariontes como en eucariontes son: putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm). Son cadenas de hidrocarburos, en cuyos extremos están ubicados dos grupos amino los cuales a pH fisiológico se encuentran con cargas positivas (en la Spd y Spm se encuentran también en el centro de la molécula). La distancia entre ellos es de 5 a 7 Å. Además de las poliaminas anteriores, se tienen otras dos más, la cadaverina y la canavalina, esta última fue encontrada en semillas de canavalia (12,13). La estructura de estos compuestos se muestra en la fig. 1

CANAVALINA:**PUTRESCINA:**

1,4 diamino butano

ESPERMIDINA:

Un grupo propil amino adicionado a Put

ESPERMINA:

Dos grupos propil amino adicionados simetricamente a Put.

FIGURA 1 Estructura de las poliaminas más comunes de ocurrencia natural en vegetales, la más reciente es la canavalina, encontrada en semilla de canavalia.

Las poliaminas son sustancias básicas que se unen fuertemente a polianiones, pero también son muy solubles en medios acuosos. Es lo hace difícil determinar su compartimentalización y localización intracelular por lo que se conoce poco sobre la distribución celular de estas aminas. En general, las células procariontes tienen mayor concentración de Spd y Spm y poca Put (2,7,8) la Spm se encuentra unida principalmente a ribosomas (1,2,5,7,8) mientras que Spd se localiza principalmente en núcleo (2,4,7).

La Put se encuentra presente en algas, hongos y varias especies de plantas superiores (2,7,8), la Spd en el alga *Chlorella*, hojas de tomate y colchicina (2,7).

Se han determinado altas concentraciones de Spd y Spm en embriones y varias partes de cereal, en varias semillas de leguminosas, en embriones de zanahoria, en tubérculos de alcornoque de Jerusalén y en semillas de una variedad de plantas superiores (2,4,7).

También la Spm y Spd se encuentran conjugados a un gran número de alcaloides vegetales (2,9,15).

1.1.2 Efecto de Poliaminas en la síntesis de macromoléculas:

En plantas las poliaminas promueven la síntesis de proteínas tanto in vivo como in vitro además sirven como un factor de crecimiento para el cultivo de ciertas células vegetales (7,11,16). Se ha propuesto que este efecto es debido a que las poliaminas están involucradas en el metabolismo de ácidos nucleicos. Un dato experimental directo que apoya la propuesta anterior es el hecho de que en embriones de pollo las poliaminas aumentan la síntesis de ARN ribosomal (4,8,9).

En sistemas de síntesis de proteínas libres de células las poliaminas tienen efecto cuantitativo y cualitativo, además son capaces de modular la especificidad de traducción del sistema. Estimulan la formación del complejo de iniciación y aumentan así la velocidad total de síntesis de proteínas (7,1,2,4).

Concluycendo, in vitro, las polianinas no solo aumentan la velocidad de síntesis de proteínas, sino también la fidelidad del proceso.

Mutantes de *E. coli* deficientes en poli-anina participan directamente en la síntesis de proteínas (17,5,8). En plantas la evidencia es limitada, pero sugiere una relación análoga entre estas aminas y el metabolismo macromolecular (4,11,2).

1.1.) Efecto de Polianinas en la estructura de ácidos nucleicos y proteínas.

Los ácidos nucleicos se llaman ácidos porque en la composición de cada nucleótido entra un residuo de ácido fosforico con carga negativa. A estos grupos negativos se unen las polianinas cargadas positivamente a pH fisiológico (3,2,8,11).

Por el método de análisis estructural radiológico se estudiaron los cristales formados entre polianinas y los ácidos nucleicos, se observó que las polianinas se combinan con los nucleótidos en distintas cadenas (complementarias) de (GU) y en (CA) recorren los sectores alejados de las moléculas pliegándose sobre sí mismas; la fecha se descansa si in vivo se realiza esta misma interacción (2, 11,12).

Las polianinas ejercen efecto protector sobre la estructura de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, la adición de poli-anina a soluciones de ácidos nucleicos aumenta su temperatura de desnaturación y disminuye su degradación por nucleasas. Los más los mejores cristales de ARN de transferencia se han logrado en presencia de Spm (5,4,3,16) indicando que esta polianina estabiliza marcadamente su estructura terciaria.

Para el caso del ADN se ha reportado que modificaciones en el contenido de Spm pueda resultar en una transformación de la forma funcional B hasta una forma no funcional E (4,2,8).

Se sabe, que las poliaminas modulan la actividad de diversas enzimas de origen bacteriano o de mamíferos y de plantas. En todas ellas concentraciones bajas de poliaminas incrementan la actividad de ADN y ARN polimerasas (2,6,7,8), mientras que altas lo inhiben, estas últimas también previenen la acción de ribonucleasas. La influencia de poliaminas en la actividad enzimática podría deberse a una interacción iónica entre la poliamina y el péptido que resulta se en un cambio conformacional beneficioso o no para la acción enzimática.

1.1.4 Cambios en los niveles de poliaminas en diversas etapas del desarrollo en plantas:

El desarrollo de una planta comprende diversas etapas entre las que se encuentran: embriogénesis, latencia, germinación, división celular, elongación y senescencia, cada una de ellas va acompañada de cambios o modificaciones en el contenido de poliaminas del tejido en estudio, e incluso se pueden modificar algunas de estas etapas por la adición de estos compuestos amínicos.

Durante el desarrollo de la semilla de arroz la concentración de poliaminas, en especial Put, se incrementa 16 días después de la fertilización declinando después gradualmente cuando el embrión es ya maduro. Este incremento de poliaminas en esta etapa de desarrollo de la semilla fue paralelo a los incrementos de ADN, ARN, proteínas y actividad de la arginina descarboxilasa (ADC), primera enzima de la vía biosintética de poliaminas en plantas (19).

La germinación de semillas de trigo y maíz va acompañada de un incremento en Spd, dos horas después de iniciada la inhibición el contenido de Spd es hasta 15 veces mayor que al tiempo cero (20)

El resurgimiento de la latencia en cortes de tubérculo de alcañafa ó en explantes de Helianthus tuberosus coincide con un incremento en los niveles de poliaminas. En estos casos se ha demostrado que el aumento en poliaminas es por síntesis de novo y se realiza durante la fase G₁ del ciclo celular, estos niveles se mantienen

durante la fase S de forma tal, que la síntesis de poliaminas se correlaciona con el aumento en la síntesis de ADN y ARN (14,21,22)

El crecimiento de un tejido puede comprender división celular y/o elongación y durante ambos tipos de procesos se han determinado los niveles de poliaminas. En general, la biosíntesis para estos compuestos es mayor donde la actividad de división celular es mayor (14,18,22,23), sin embargo, las diversas poliaminas presentan su propio gradiente donde la elongación celular es el principal proceso del crecimiento (4,6,12,23,24).

La senescencia o envejecimiento de un tejido vegetal se caracteriza principalmente por una disminución en la funcionalidad -- membranal e hidrólisis de macromoléculas. Esto trae como consecuencia la pérdida de compartimentalización celular, función bioquímica de organelos, material genético, síntesis de proteínas y clorofila (3,16,25).

Las poliaminas son inhibidores potentes de la senescencia cuando son aplicados a diversos tejidos vegetales, la Put, Spd y Spm exógenas, así como precursor L-arginina, decrecen la velocidad de senescencia de protoplastos de la hoja de avena (16,18,21,26) estabilizándolos contra la lisis y aumentando la síntesis neta de proteínas y ARN. Este tratamiento también induce la síntesis de ADN y la actividad mitótica. En más, el tratamiento de los segmentos de hoja aislada de diferentes especies de plantas con poliaminas retardan la degradación de la clorofila y previenen el aumento de la actividad de la ARNasa y de la proteasa que acompañan al fenómeno de senescencia (27,16,26,25,28). En hojas de avena los niveles de Put, diamino propeno y agmatina son mayores en hojas jóvenes y declinan con la edad; del mismo modo la actividad de la ADC, primera enzima en la vía biosintética de poliaminas, decrece progresivamente en la primera hoja a medida que tiene más edad (4,8). Una tendencia similar se presenta en hojas aisladas envejecidas en la oscuridad (4,8)

1.1.3 Efecto de poliaminas en membranas:

Las propiedades estructurales de las poliaminas a pH fisiológico sugieren que las poliaminas interaccionan con los grupos aniónicos de las membranas, lo cual produciría estabilidad membranal y prevendría la fuga de solutos.

Algunos sistemas utilizados para determinar la influencia de poliaminas en estabilidad membranal han sido: cultivo de células de manzanas, tejido almacenado de nabo (rutabaga) y hojas de disco de espínacas, entre otras. Cuando estos tejidos se tratan con varias guanidinas alifáticas, que inhiben la síntesis de poliaminas, se induce un incremento del flujo de iones que puede revertirse por la adición de Spm o de CaCl_2 (29,25,31).

El efecto protector que las poliaminas presentan sobre la germinación de algunas semillas a altas temperaturas (4,8) probablemente se debe también a la capacidad que tienen estos compuestos de mantener la integridad membranal. El Ca^{2+} y la Spm tienen efectos inhibitorios sobre la biosíntesis de etileno en discos de manzana, este efecto es dependiente de temperatura. Se ha demostrado que en la síntesis del etileno participan algunos componentes membranales y probablemente el Ca^{2+} y la Spm actúan previniendo y/o alterando la microviscosidad membranal (31,32,33,34).

La actividad de enzimas asociadas a las membranas, también es modulada por poliaminas, en forma indirecta, a través de modificar las propiedades de la bicapa lipídica (37,38,39).

El hecho que los efectos de Spm en la modificación de propiedades de membranas sea también efectuada por Ca^{2+} sugiere que poliaminas actúan a través de interacción iónica con los componentes membranales.

1.1.5 Poliaminas y fitohormonas:

En algunos sistemas animales el efecto hormonal es acompañado por aumento en la biosíntesis de poliaminas. La adición de hormona

al tejido blanco incrementa la actividad de ornitina descarboxilasa (ODC), la primera enzima y control regulatorio de la biosíntesis de poliaminas, este incremento en la actividad enzimática es esencial a la acción hormonal. La inhibición de la biosíntesis de poliaminas por la adición de diversos inhibidores cancela el efecto hormonal y en algunos casos la aplicación de Put puede restar unar parcial o completamente el bloqueo (3c).

En plantas, sucede algo similar, la aplicación de cualquiera de los fitoreguladores que regulan el crecimiento (auxinas, etc., giberélicos, citoquininas u etc. abscisico) a tejidos específicos puede causar una elevación en la biosíntesis y concentración de poliaminas.

La latencia de explantes de tubérculo de Helianthus tuberosus se rompe por la adición de una auxina como el 2,4-D. Este desarrollo metabólico va acompañado por un incremento en Put, Spd y Lpa en una relación 4:2:1 respectivamente con respecto a los contenidos presentes en el tejido latente (19). Más aún los efectos morfogenéticos asociados con el crecimiento inducido por auxinas son similares a los inducidos por la adición de poliaminas en ausencia del fitoregulador (40). Citoquininas incrementan el contenido de Put en plántulas de lechuga (24,41) y en cotiledones de pepino la benziladenina incrementó los niveles de Put y la actividad de AOC, aunque los niveles de Spd y Lpa se recuperaron 40%, si este mismo sistema de abscisico (ABA) disminuye los contenidos de Put y la actividad de AOC (42).

La aplicación de quinolina, etc. giberélico y etc. indolacético a semillas de arroz germinado, incrementó la actividad de AOC hasta 10 veces por encima del control mientras que el etc. abscisico la inhibió (44).

Utilizando inhibidores de la síntesis de poliaminas como VONG y DFMA, inhibidores de ODC y AOC, se ha mostrado que el aumento de la biosíntesis de poliaminas es necesario para que el fitoregulador promueva el crecimiento. En chicharos ensados la elongación de internodos se estimula por la edición de ^{14}C . Simultaneo al crecimiento se observó un incremento en los niveles de poliaminas y en

la actividad de AOC (8,45). La adición de DFXA al sistema inhibe la elongación, que se revierte por la adición de Pat (8). Efectos similares se han reportado en hipocotiles de lechuga(41).

Las evidencias hasta aquí presentadas sugieren que las poliaminas están mediando intracelularmente el efecto hormonal en semillas y de los fitoreguladores en plantas, actuando como "segundos mensajeros".

Sin embargo, para la validación de esta hipótesis se requiere demostrar que el fitoregulador induce la biosíntesis de poliaminas per se y no en forma indirecta a través de inducir el crecimiento, que como se muestra en la sección anterior requiere de síntesis de de, nucleótidos y proteínas y otros tipos de metabolismos parecen estar relacionados con el de poliaminas.

I.2 Estructura del grano de cereal:

En una semilla de cereal se distinguen dos regiones genéticamente diferentes: Endospermo y embrión.

I.2.1 Endospermo: El endospermo está formado principalmente por dos tejidos: El endospermo almidonero y la capa de aleurona.

I.2.1.1 Endospermo almidonero: Está constituido por células de pared delgada, las cuales tienen diferentes tamaños, formas y composición, dependiendo de la zona en que se encuentran. Son células muertas, ricas en almidón en forma de gránulos, espaciados juntos en una matriz formada por la proteína de reserva. Durante la germinación estas reservas son hidrolizadas y proporcionan al embrión los metabolitos y energía necesaria para su desarrollo.

I.2.1.2 Capa de aleurona: Capa más externa de células vivas, que rodea al endospermo almidonero. En el caso del trigo la aleurona está formada por una sola capa de células oblicuas, mientras que en cebada está constituida por tres. Estas células no contienen almidón, están vivas y respiran, pero no crecen ni se dividen; Su citoplasma es denso y rico en proteínas, lípidos y diversos organelos(49,51,54).

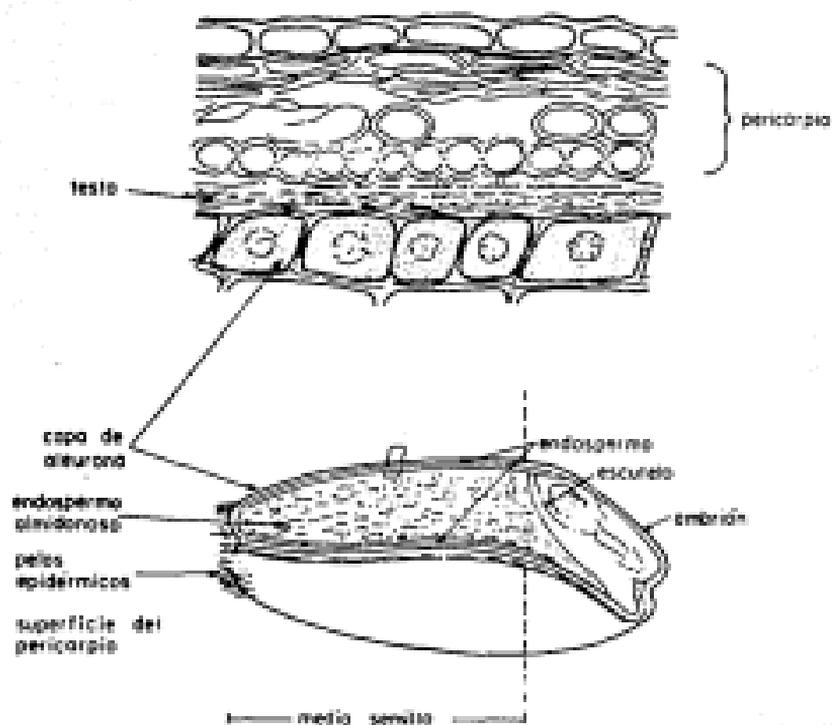


Figura 2. Corte longitudinal de grano de trigo en donde se muestran las partes anatómicas más importantes. (52)

1.2.2 Embrión: El embrión a su vez está formado por dos tejidos: escutelo y eje embrionario.

1.2.2.1 El eje embrionario es la plántula en desarrollo.

1.2.2.2 El escutelo, es el tejido que relaciona o comunica al embrión con el endospermo almidonoso y la capa de aleurona. Este tejido está encargado de hacerle llegar los nutrientes al eje embrionario provenientes del endospermo en las primeras etapas de la germinación.

Tanto el embrión como el escutelo poseen materiales de reserva de disponibilidad inmediata.

1.2.3 Composición y Distribución química de la semilla de cebada

La semilla de cebada al igual que otros cereales contiene -- principalmente: Almidón (76%) y en menor proporción proteínas (12%) lípidos (1%) y minerales (1%) (49).

El almidón se encuentra localizado principalmente en el endospermo almidonoso (76%) mientras que las proteínas se encuentran distribuidas tanto en embrión (11%) como en escutelo (26%) y capa de aleurona (19%). El escutelo y la capa de aleurona son ricos en triacilgliceridos y los minerales Mg^{2+} , Na^+ , K^+ y Ca^{2+} asociados con el cuerpo proteico en la capa de aleurona en forma de sales de ácido fítico (49,50).

1.3 Proceso de Germinación:

El ciclo de vida de una planta comienza con la etapa denominada de GERMINACIÓN, la única considerada en este trabajo.

Esta etapa se ha definido como:

"La secuencia de pasos morfofisiológicos que dan por resultado la transformación del embrión en plántula" (51,53).

"Aquellas actividades que precipitan la ruptura de la testa por emergencia de la radícula" (33,54).

En este trabajo se definirá como:

"El conjunto de eventos fisiológicos y bioquímicos que experimenta la semilla hasta el establecimiento de la plántula como un organismo autotrofo".

En general, para que una semilla germine requiere de condiciones adecuadas de: Humedad, temperatura, oxígeno, luz, balance de - fitohormonas, etc.

La germinación puede dividirse en dos grandes etapas:

La primera se efectúa en el embrión y da comienzo cuando la semilla se coloca en agua y se hidrata (imbibición). Este aumento en el -- contenido de agua en la semilla provoca la iniciación y establecimiento de una serie de procesos bioquímicos y fisiológicos que culminan con la protrusión de la radícula.

La segunda etapa ó movilización de reservas consiste en la degradación de los productos almacenados en el endospermo almidonado, como son el almidón, las proteínas y los Ac. nucleicos, los cuales -- se hidrolizan hasta sustancias más simples, mediante la acción de enzimas hidrolíticas (alfa-amilasa, proteasa, RNasa, etc) que son aportadas por las células de la capa de aleurona.

Estas sustancias simples, como mono y disacáridos, aminoácidos y los nucleótidos son utilizados por el embrión germinante para su crecimiento posterior.

1.4 Movilización de carbohidratos:

El almidón, sustancia de reserva más abundante de cereales, - requiere para su hidrólisis las siguientes enzimas: alfa-amilasa (alfa(1,4) glucanohidrolasa), beta amilasa (alfa(1,4)glucanomal-todrolasa) enzima desramificante y glucosidasa.

El almidón se encuentra en 2 formas, la alfa amilosa y la amilopectina. La alfa amilosa está constituida por cadenas largas no ramificadas, en las que todas las unidades de D-glucosa se hallan unidas mediante enlaces alfa (1-4). Las cadenas polidispersas

varian en peso molecular desde unos millones hasta 500,000. La amilosa no es verdaderamente soluble en el agua, pero forma micelas hidratadas que dan un color azul con el iodo. En tales micelas la cadena polisacáridica está retorcida, constituyendo un arroyamiento helicoidal.

La amilopectina está muy ramificada, la longitud media de las ramificaciones es de 24 a 10 residuos de glucosa, según la especie. Los enlaces glucosídicos del esqueleto son alfa (1-4), pero los de los puntos de ramificación son enlaces alfa(1-6).

La amilopectina produce disoluciones coloidales o micelares - que dan una coloración rojo violacea con el iodo. Su peso molecular puede llegar hasta 100 millones.

Los componentes principales del almidón pueden ser hidrolizados por dos caminos diferentes, como se muestra en la fig 3.

1.5 Control hormonal en la movilización de reservas:

Como ya se menciona, durante la germinación el embrión sintético de giberélico (AG_3) al cual difunde hacia el endospermo almidonoso hasta alcanzar la capa de aleurona, donde se sintetizan diversas enzimas hidrolíticas que al ser secretadas hacia el endospermo almidonoso, degradan las sustancias de reserva (52,56,57,59).

La síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas está regulado principalmente por dos fitorreguladores: AG_3 que actúa como agente inductor (47,48) y el ABA como inhibidor(56,56,5,64).

La mayor parte de los estudios concernientes al modo de acción de AG_3 y ABA en el metabolismo de la capa de aleurona se ha hecho en tejido aislado de medias semillas sin embrión, lo cual hace al sistema dependiente de la adición exógena de estos fitorreguladores. El tejido aislado responde de igual forma que lo hace en semillas completas (60,67,62,6).

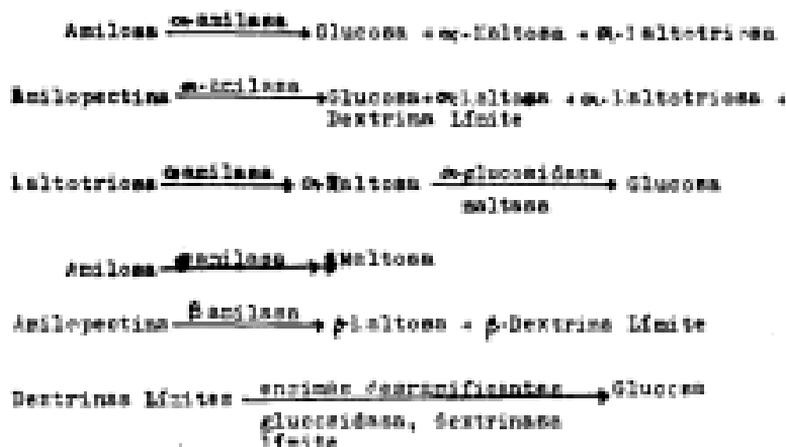


Fig 3 . Serie de reacciones que ejemplifican mejor la acción de las enzimas que intervienen en la degradación de carbohidratos (almidón) (45).

go de concentración de AG_3 utilizado $10^{-6}M$ a $10^{-4}M$ (59,67) fig.4

Higgins y cols demostraron que el ARNm para alfa amilasa comienza a incrementarse (2-3 h) después de la inducción con AG_3 (68, 69) y su formación es inhibida por inhibidores de la transcripción como actinomomicina D (60,66,70), también se ha mostrado que inhibidores de la síntesis de proteínas como puromicina y cicloheximida inhiben la síntesis de esta enzima (59,60,71).

Se tienen datos que el AG_3 aumenta la incorporación de bases y ribonucleótidos marcados en ARN poly(A) en caps de aleurona de cebada (70) y trigo (74).

Esta fracción de ARN poly(A) inducida por AG_3 fue aislada y traducida en un sistema de síntesis de proteínas libre de células obtenidas del germen de trigo, identificándose a la alfa amilasa como uno de los productos de traducción del ARNm (69,60,64).

Por otro lado Bernal y cols (59,67) utilizando técnicas de hibridación de Δc . nucleótidos cuantificaron los niveles de ARNm de alfa amilasa existente en aleurona en presencia y ausencia de AG_3 . Los resultados indican que el ARNm de alfa amilasa se encuentra presente en aleuronas antes del tratamiento con AG_3 .

El ARNm empieza a aumentar dos horas después de agregar el AG_3 encontrándose hasta 40 veces más mensajero de alfa amilasa después de 16 h de haber iniciado el tratamiento.

Así se demostró que la cantidad de ARNm comienza a incrementarse entre las 2-3 h de iniciarse la inducción con AG_3 , el nivel de ARNm aislado de la aleurona tratada, concuerda con la velocidad de síntesis de alfa amilasa obtenida in vitro, el mesos para las 12 primeras horas (59,66,75).

Lo anterior concuerda con lo encontrado por Higgins (66) e indica que el AG_3 actúa a nivel transcripcional.

Los principales eventos moleculares que suceden después de la biosíntesis de los ARNm necesarios para la inducción de la alfa amilasa en las primeras 12 h son: la traducción de este mensajero y la secreción. Sin embargo, durante la fase de traducción se obser-

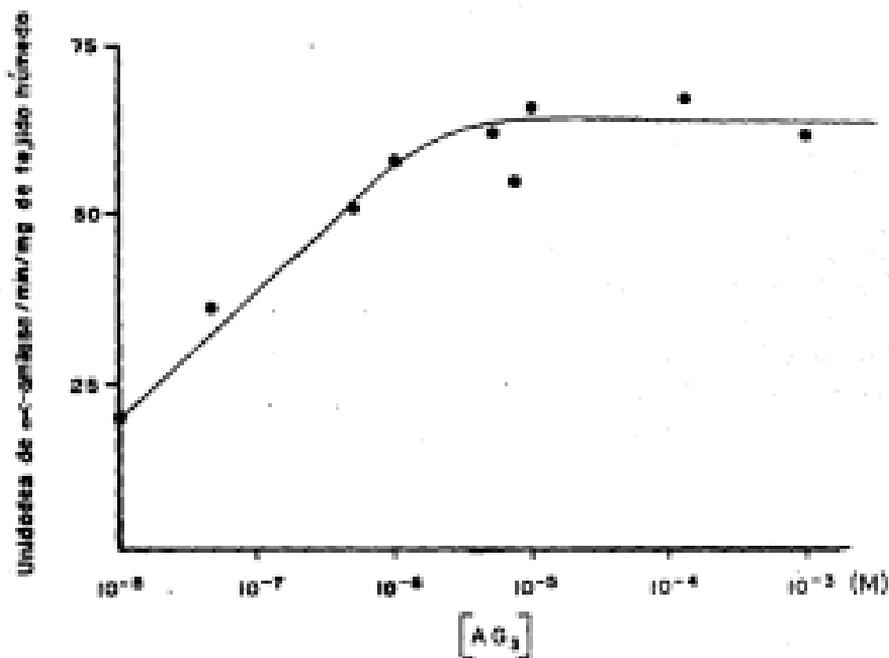


Figura 4. Produção de alfa-amilase em resposta a ácido giberélico (AG_3)

vé que eliminando el AG_3 se inhibía el aumento posterior de la actividad de alfa amilasa y que al volverlo agregar se reestablecía dicho aumento (59). Sugiriendo que el AG_3 además de inducir la síntesis de ARNs específicos para alfa amilasa está también modulando su traducción (59). La información antes descrita demuestra que el AG_3 regula la transcripción de los genes de alfa amilasa y sugiere también tener efectos a nivel post-transcripcional (59,64).

Con el fin de determinar cuál de estos niveles de regulación era el limitante en el proceso completo de expresión de genes de alfa amilasa, Bersal (59) determinó la concentración de el AG_3 requerido para elevar la mitad del efecto máximo en la traducción, encontrando que ésta es de aproximadamente 50 veces mayor que las requeridas para la transcripción del mensajero de alfa amilasa por tanto la traducción es el paso limitante en la expresión de los genes de alfa amilasa por AG_3 .

La alfa amilasa es una enzima de exportación y en otros sistemas se tiene que este tipo de proteínas se sintetizan en poliosomas unidos a membranas, por lo que diversos investigadores se han dedicado a estudiar la función de retículo endoplásmico en la síntesis y transporte de esta enzima (74,77,82,78).

Estudios con microscopía electrónica de capas de aleurons de cebada tratadas con AG_3 muestran que existe un notable aumento de proliferación de RER, distensión de cisternas y desarrollo de vesículas derivadas del sistema de Golgi, acompañados por una disminución en el número de esferosomas y granulos de aleuron. Resultados similares son encontrados por Vigil & Boddet (80) los que además reportan que la secreción de alfa amilasa en aleurons tratada con AG_3 se asocia con un desarrollo extensivo de RER y derivadas vesiculares y que estos eventos son fuertemente inhibidos por actinomicina D.

Considerando todo lo anterior podemos decir que la síntesis de alfa amilasa inducida por AG_3 en la capa de aleurons va acompañada de:

- (1) Síntesis de novo del polipéptido
- (2) Un rearrreglo endomembranal: Formación de RER
- (3) Síntesis y acumulación de ARNm de alfa amilasa

Por tanto el AG_3 regula la síntesis de dicha hidrolasa tanto a nivel transcripcional como traduccional.

1.5 Papel del calcio en actividad y transporte de alfa amilasa:

El Ca^{2+} tiene un papel importante en el tráfico intracelular de diferentes macromoléculas en diversos sistemas secretorios de células animales (59). En plantas se ha demostrado que su presencia es requerida en el funcionamiento de sistemas secretorios de proteínas y en el transporte y retención normal de iones (54,78,81).

Desde la natural función regulatoria, el Ca^{2+} es frecuentemente categorizado como un segundo mensajero.

Por otro lado, el efecto de Ca^{2+} en la secreción de alfa amilasa y otras hidrolasas en la capa de aleurona de cebada, fue primeramente reportada por Christeels & Varner (54). Ellos demuestran que el Ca^{2+} junto con el AG_3 son necesarios para obtener altos niveles de actividad de alfa amilasa en aleuronas aisladas, además proponen que la enzima secretada es inactivada irreversiblemente en ausencia de Ca^{2+} (78). Eliminando Ca^{2+} de el medio de incubación de aleuronas preincubadas en 5 μM de AG_3 y 3 mM de $CaCl_2$ resulta en una reducción 70-80% en la secreción de actividad de alfa amilasa al medio de incubación (78,79). Subsecuentemente también muestran que el efecto de Ca^{2+} en la producción de alfa amilasa es selectiva. El efecto de Ca^{2+} parece estar muy relacionado con la biosíntesis de isoenzimas de alfa amilasa inducidas por AG_3 , previamente observadas (60). Jones & Johnson (78) empleando pulcra marcados con (^{35}S) metionina y análisis inmunquímico utilizando anticuerpo específico, demuestran que eliminando el Ca^{2+} del medio de incubación de las aleuronas de cebada tratadas con AG_3 , desaparece el grupo B pero no el grupo A de isoenzimas, la alfa amilasa conti-

ent al Ca^{2+} como metaloenzima, así se tiene que el Ca^{2+} sirve, además, para estabilizar el grupo B de isoenzimas (76,78).

Es conveniente señalar que la actividad de alfa amilasa está constituida por dos grupos de isoenzimas las cuales se han designado de como Grupo I y Grupo II continuación se mencionan sus principales características (72,67,75,76,82,83):

<u>Grupo II</u>	<u>Grupo I</u>
No se libera en ausencia de Ca^{2+}	Liberación en ausencia de Ca^{2+}
Su actividad es inhibida por EDTA	Su actividad es insensible a EDTA
Actividad inestable a pH bajo	Actividad estable a pH bajo
Actividad estable a agentes reductores de grupos sulfhidrilo (mercaptoetanol, ditionitrosol) en la aleurona.	Actividad inestable a agentes reductores de grupos sulfhidrilo en la aleurona
Punto isoelectrico desde pH 5.9-6.6	Punto isoelectrico desde pH 4.4 - 5.2

Resumiendo: En la aleurona la secreción y biosíntesis de la alfa amilasa, así como la secreción de otras proteínas incluyendo diversas hidrolasas félicas dependen de la presencia de Ca^{2+} en el sistema.

Algunos investigadores han propuesto (85,82,76) que el paso de la secreción de la enzima puede darse en dos etapas, secreción y liberación, el primero implica el transporte de la enzima através de la membrana plasmática y la segunda, el movimiento de la enzima através de la matriz de la pared celular de la aleurona, este los definen como la liberación de la enzima. Las evidencias en que se apoyan para esta propuesta es que la liberación se incrementa al adicionar iones al medio de incubación, especialmente Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ , además proponen que la pared celular de la aleurona actúa como un intercambiador ion-proteína y que el papel de los iones es facilitar el movimiento de la enzima através de la pared.

Por otro lado, utilizando análisis de energía dispersa de rayos X y análisis de activación neutrón (E1) se determinó el contenido de minerales en granos de semillas de cebada. El análisis de energía dispersa de cuerpos proteicos en células de aleurona mostró un bajo contenido de Ca^{2+} en relación a P, Mg, K, mientras que el análisis por activación neutrón indica que el endospermo contiene muy poco Ca^{2+} en relación a los otros tres elementos, sugiriendo que el endospermo puede servir como fuente de giberelinas y de calcio a la capa de aleurona durante la germinación de granos intactos.

"Sostengo que el sentimiento religioso c6mico
es la motivaci6n m's fuerte y noble para la
investigaci6n cientifica. "

Albert Einstein
Ideas y Opiniones (1954)

"... No hay como sentarse a contemplar los astros
en una noche muda y alargada
cuando la cauda de la galaxia
se riega como leche en el fondo de la infinitud..."

Roberto Pizano.

"El maestro es la base de la educaci6n"

Thomas Carlyle

OBJETIVOS

Al igual que otras investigaciones, esta que se plantea no es única, pero servirá para seguir esclareciendo la compleja acción molecular de AG_1 sobre la síntesis de novo de alfa amilasa.

Considerando lo descrito anteriormente se propusieron los siguientes objetivos:

- 1.- Determinar los niveles de PMS en copa de aleurona de cebada durante la inducción de alfa amilasa.
- 2.- Determinar los niveles de PMS, en aleuronas de cebada, en presencia de un antagonista de la acción de AG_1 como es ADA.
- 3.- De existir esta relación-efecto se determinará como influyen dichos niveles en la inducción de alfa amilasa.
- 4.- Los puntos 1,2,3 se realizarán por comparación con un sistema de aleurona deteriorado.

Los resultados obtenidos contribuirán a involucrar a los PMS como "segundos mensajeros" de la acción de fitorreguladores, AG_1 en particular.

7.- MATERIAL Y MÉTODOS.

II.1 Material biológico.

En el presente trabajo se utilizaron semillas de cebada (*Hordeum vulgare*) variedad Him-laya, cosecha 1979.

Se trabajó con dos lotes de semillas que llamaremos a lo largo de este trabajo SEMILLAS CONTROL y SEMILLAS DETECCIONADAS (ó de PLAZO VIOSO).

El lote llamado control mostró una germinación del 50% a las 24 h., mientras que el deteriorado mostró una germinación de 60-65% a las 24 h., sin embargo su viabilidad fue de 80-85%. El control mostró una viabilidad del 95%.

II.2 Material de vidrio

El material de vidrio utilizado en la irraditación, incubación de las aleuronas y determinación de la actividad enzimática se lavó con detergente comercial, se enjuagó abundantemente con agua destilada y se secó en una estufa a 70°C.

Los tubos utilizados en la cuantificación de polisacáridos se sumergieron en una solución de HNO₃ al 50% p.p. toda la noche, se enjuagó abundantemente con agua de la llave seguido de agua destilada y se secaron en una estufa a 100°C.

II.3 Aparatos

Se utilizaron:

- Cámara de flujo laminar marca "Mitachi"
- Incubadora con agitación a 25°C \pm 1°C
- Bañó de agua con control de temperatura
- Centrífuga JA-20 con rotor J2-21
- Espectrofotómetro marca "Pye-Unicam"
- Espectrofluorómetro marca "Teiss"
- Espectrofluorómetro marca "Perkin Elmer"

11.4 Reactivos

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron grado - analítico. El $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (10₃) y el cloruro de benzil (Benz-Cl) fueron de marca Sigma.

11.5 Soluciones utilizadas en la desinfección y esterilización de material de vidrio.

En la desinfección de las medias semillas se utilizó una dilución al 20% del blanqueador comercial "cloralex".

Las soluciones utilizadas en las incubaciones de capas de algas, se esterilizaron através de membranas Millipore tipo HA de 0.45 μm (1 membrana por litro).

El material de vidrio, filtros, agua bidestilada y soluciones se esterilizaron en autoclave a 120°C; 1.2 Kg/cm² por 20 min.

11.6 Desinfección e inhibición de medias semillas.

Medias de cada lote (CONTROL Y DEFECHADO) se cortaron - transversalmente eliminando el embrión y extremo distal (media semilla). Las medias semillas se colocaron en botras erlenmeyer de 250 ml y se les agregó 50 ml de cloralex al 20%, se dejaron reposar por 20 min con agitación ocasional, pasado este tiempo se eliminó la solución de cloralex por decantación, se transfirieron 50 medias semillas a cajas petri de 9 cm de diámetro conteniendo 7 discos de papel filtro whatman #1 y 5 ml de agua bidestilada estéril. Las cajas petri con las medias semillas se dejaron en la obscuridad - durante 72 h a 25-27 °C.

11.7 Aislamiento de las capas de algas.

Se eliminó cuidadosamente el endosperma almidonado de las medias semillas criadas por 72 h, con la ayuda de 2 espátulas. Las capas de algas con e sin testa (capa gruesa de células muertas) se transfirieron a una caja petri en lotes de 10 algas en

agua estéril.

Apartir de este punto se trabajó nuevamente en ambiente estéril. Los capas de aleurona se transfirieron a botellas erlenmeyer de 125 ml con tapón de goma para efectuar los diferentes tratamientos: se enjuagaron repetidas veces con agua bidestilada hasta no observar traces de cloróformo en las aguas de lavado fig. 7.1

11.8 Tratamiento de las capas de aleurona con fitohormonas.

Lotés de 50 capas de aleurona se incubaron en botellas erlenmeyer de 125 ml con resaca conteniendo 10 ml de buffer de incubación (Ca. Succinico 20 mM pH 5.6 y CaCl_2 20 mM) en presencia o ausencia de fitoreguladores.

Se utilizaron cuatro diferentes tratamientos:

- 1.- AG, 5×10^{-6} M (+AG)
- 2.- solo buffer de incubación (-AG)
- 3.- IBA 1×10^{-2} M (+IBA)
- 4.- mezcla de AG y IBA a las concentraciones antes señaladas (+AG +IBA)

En la fig. 7.2 se muestra los diferentes tratamientos a los cuales se sometieron las capas de aleurona, así como su posterior utilización.

11.9 Determinación de poliaminas libres en capa de aleurona.

11.9.1 Extracción de poliaminas de tejido de aleurona

Lotés de 50 aleuronas incubadas por diferentes períodos de tiempo en presencia o ausencia de fitoreguladores (secc. 2.6) se homogenizaron en un mortero con tres ml. de HClO_4 0.4% y una pizca de arena, el homogenizado se transfirió a un tubo ecorx y se agitó por 1h en baño de hielo, se centrifugó a 10,000 g X 20 min. a 2°C , la fase del sobrenadante conteniendo las poliaminas "libres" o solubles en HClO_4 se guardó en un vial de plástico previamente etiquetado.

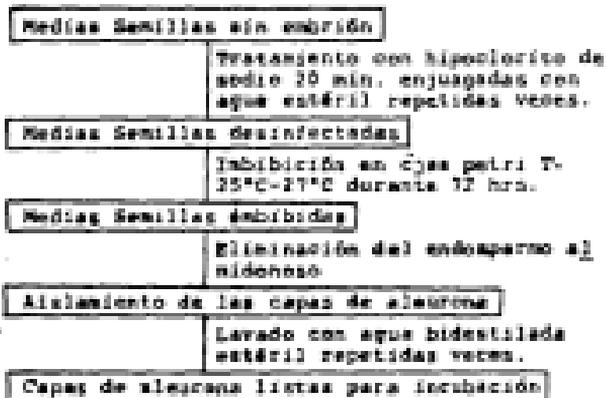


Figura 3.1 Aislamiento de Capas de Aleurona.

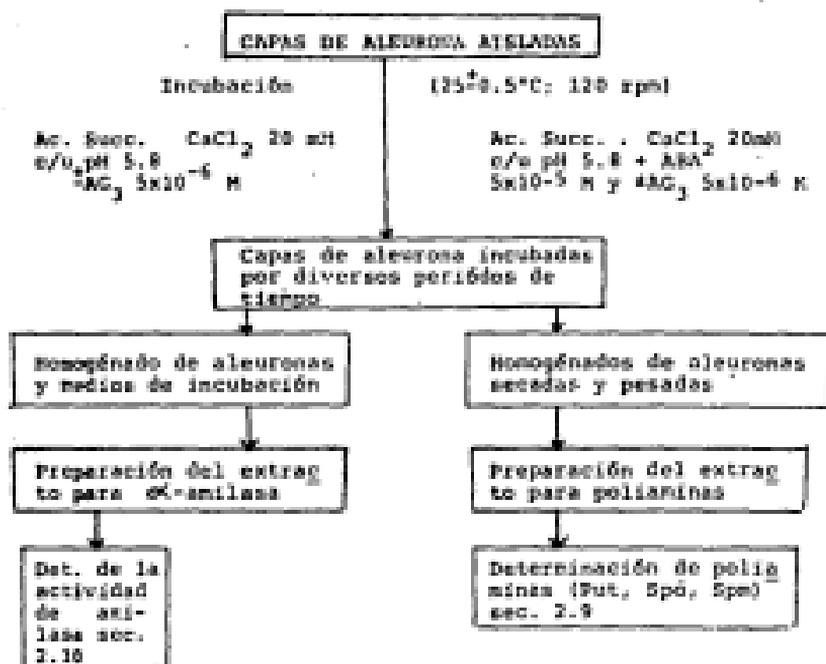


Figura 3.3 Tratamiento de capas de aleurona con fitorreguladores y su utilización posterior.

La pastilla se reesuspendió nuevamente con tres ml. de HClO_4 0.4N frío, se centrifugó 10,000 g X 20 min a 7°C , el sobrenadante obtenido se juntó con el peso anterior y se almacenó a 20°C en vial de plástico. Los extractos en HClO_4 son estables para el análisis de poliaminas hasta por una semana.

11.5.2 Derivación y cuantificación de poliaminas libres.

El Cloruro de 1-Dansil Amino - Naftalen - 5 Sulfonilo (Cloruro de Dansil Dans-Cl) reacciona con aminas primarias y secundarias, fenoles y otros alcoholes, indoles, etc., fué descubierto por Weber en 1957 (86).

El Dans-Cl es un reactivo no específico y por tanto debe utilizarse en conexión con un método apropiado de separación, como -- por ejemplo la cromatografía en capa fina.

Los derivados dansilados producen una intensa fluorescencia -- amarilla, cantidades hasta del orden de 5 nanomoles (nmol) de un amino puede ser determinada por fluorescencia directa en cromatografía de capa fina con buena exactitud (85). En este trabajo se utilizó esta metodología para separar y cuantificar las poliaminas más abundantes en organismos subterrestres: Put, Sp2 y Sp3.

11.5.2.1 Método para la síntesis de los derivados dansilados de poliaminas.

El método utilizado fué el descrito por Flores y Solsten (47) con algunas modificaciones.

200 μl de extracto ácido (fig. 2.) se mezclaron con 400 μl de Dans-Cl (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en acetona recién preparado) y 200 μl de carbonato de sodio saturado, la mezcla se agitó vigorosamente (vortex) y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente por toda la noche.

Para eliminar el exceso de Dans-Cl a la mezcla anterior se le agregó 200 μl de prolina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en agua), se incubó por otros 10 min.

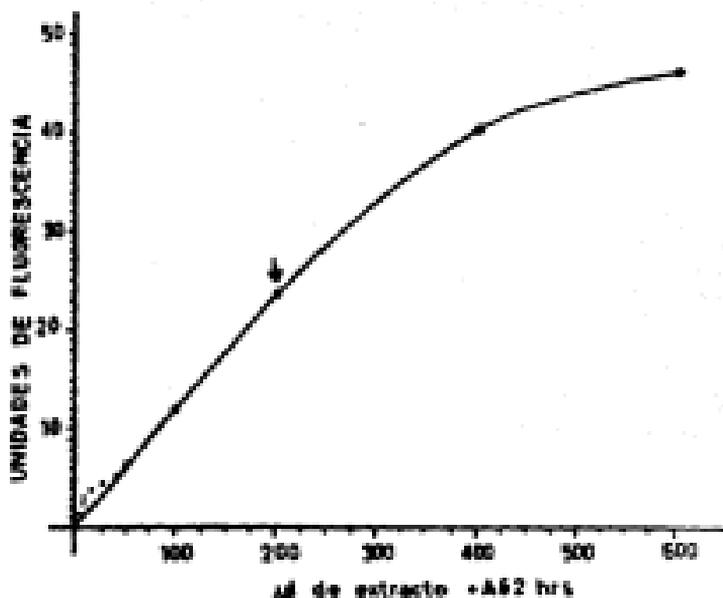


FIGURA 2.3 DETERMINACION DE MICROLITROS DE EXTRACTO OPTIMO PARA EL METODO DE DANFILACION.

La curva nos muestra que la cantidad escogida de extracto para la danfilación se encuentra en la parte lineal.

Las poliaminas demulsadas se extraerán en 1 ml de benceno agitando por 1 min. (en vortex). La mezcla se separó en dos fases acuosa y orgánica, esta última se colectó en tubos de vidrio y se llevó completamente a sequedad con ayuda de baño maría y vacío. - Se almacenaron a -20°C por toda la noche (fig.2.4). Las poliaminas son estables hasta por una semana a esta temperatura sin descongelar.

Los residuos de poliaminas fueron disueltos en 200 μl de benceno y aplicados en placas de sílica gel de alta resolución, DC Fertig Platten Kieselgel 60 de 20 x 20 cm, marca Merck.

Las muestras se aplicaron a 2 cm de la base de la placa con ayuda de una microjeringa de 100 μl , procurando que el tamaño de la muestra fuese lo más pequeña posible. Esto se repitió para todas las muestras demulsadas, fig. 2.5

Para la identificación y cuantificación de las poliaminas se utilizaron estándares: De una solución acuosa 0.1 l de cada una de las poliaminas (Put, Spd, Spa) se tomaron 15 μl , se demulsaron siguiendo la técnica antes descrita (1500 moles demulsadas de cada poliamina).

Para la identificación de las poliaminas se secularon nanomoles demulsados de cada poliamina en un espendidor (vial de plástico) y se aplicó una pequeña cantidad de muestra, 15 μl , en la base de las placas de sílica gel, fig. 2.6.

Las placas conteniendo las muestras aplicadas y los estándares se corrieron en una cámara cromatográfica utilizándose como eluyente dos solventes orgánicos: cloroformo y trietilamina (25:2v/v)

El corrimiento del cromatograma se dio por terminado cuando el frente del eluyente estaba 1 cm del final de la placa, fig.2.6. Se revelaron las placas con una lámpara U.V. Las manchas que coincidirán ó aparecerán con el Rf de la respectiva poliamina de referencia se marcaron y rasparon, para extraerse posteriormente en uno ó uno y medio ml., de acetato de etilo, dependiendo del espectrofluorómetro utilizado para su lectura.

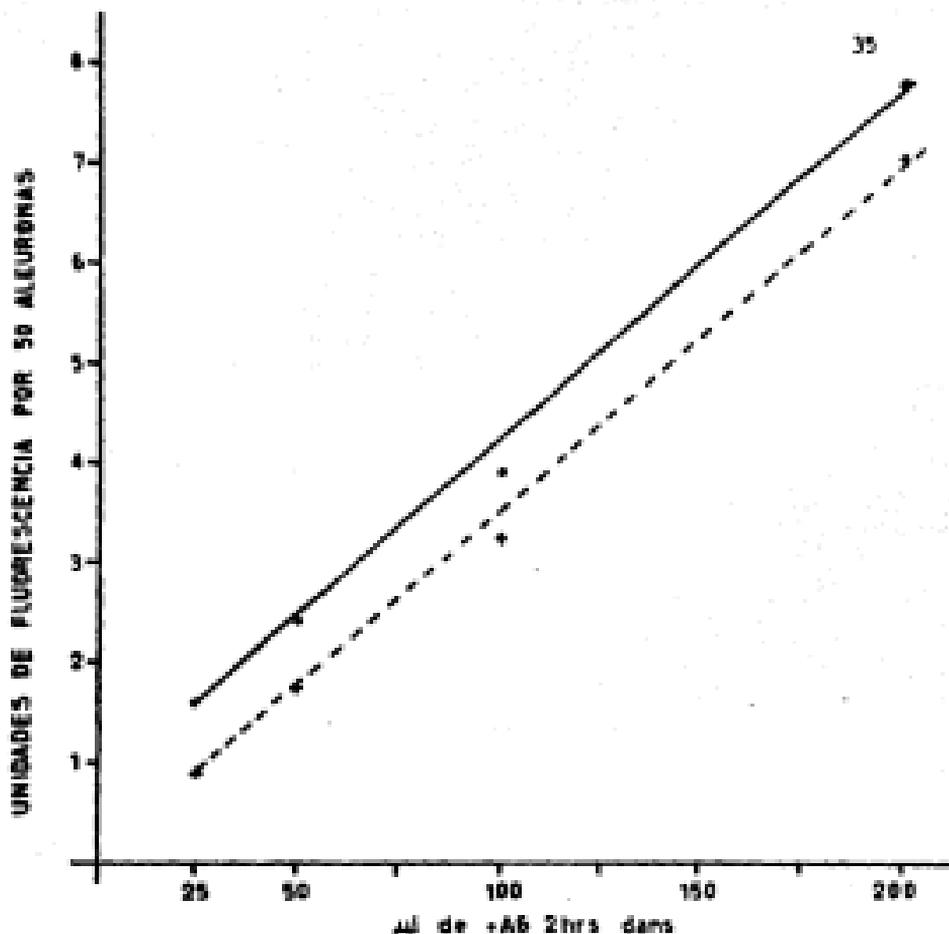


FIGURA 2.4 CURVA DE ESTABILIDAD DE COMPUESTOS DANILADOS RESPECTO AL TIEMPO.

Los extractos se graficaron con extracto de:
+AG 2hrs.

Línea continua (●—●) son lecturas del 1er día

Línea discontinua (□---□) son lecturas del 20o día

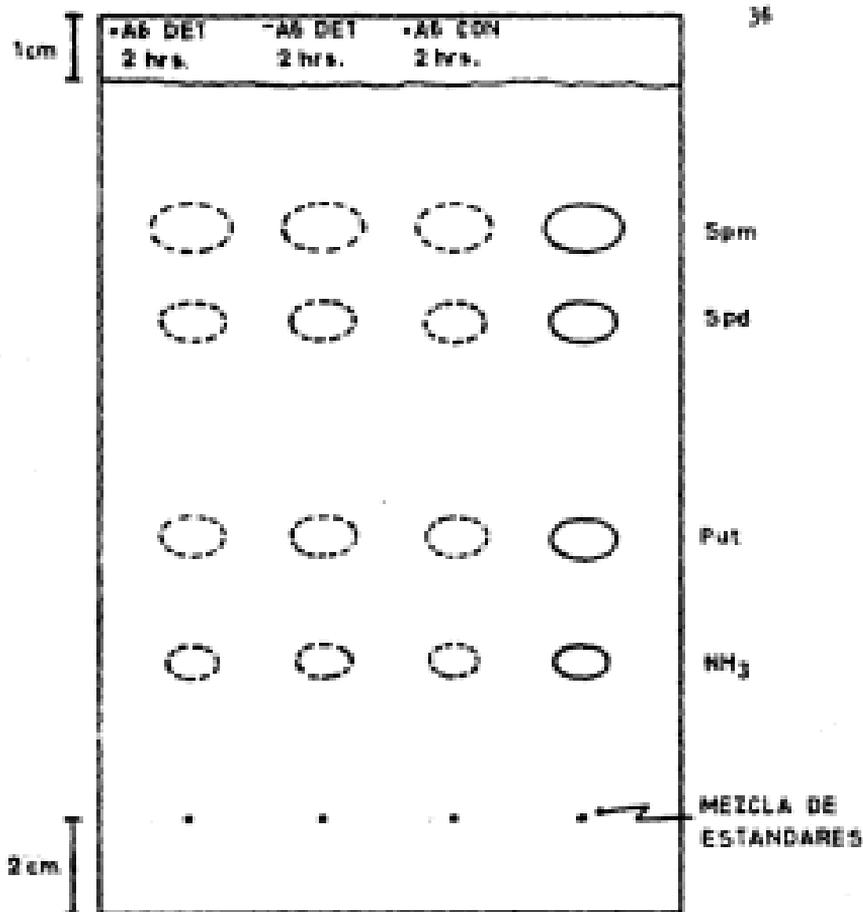


FIGURA 2.5 PATRON DE ELUCION DE POLIAMINAS.

Corrientes de las placas de silica gel conteniendo los diversos tratamientos y el orden de aparicion de poliaminas en el solvente de eluccion cloroformo-trietilamina(25:2 w/v).

Las condiciones para la cuantificación de poliaminas en los espectrofluorómetros fue:

- SFF-500 Corrected Spectra Spectro Fluorometer: out put on the J 4-897; X-Y, marca Perkin Elmer, fig. 2.7; 2.8; 2.9
 - λ en 480 nm Band Pass exc. 0.2
 - λ exc 350 nm Band Pass em. 2.0
 sensibilidad: 5, ajustando a 50 U.F. con 10 μl de Put-dans en 1 ml de acetato de etilo.

- Fluorómetro Zeiss, fig. 2.10; 2.11 y 2.12
 - λ en 491 nm filtro 2a
 - λ exc 366 nm filtro 1a
 se ajustó a 1 U.F. con 10 μl de Put-dans en 1.5 ml de acetato de etilo.

En la fig. 2.6 se muestra el esquema general de constitución, extracción y cuantificación de poliaminas Put, Spi y Spm en capas de aleurona de cebada.

11.30 Determinación de la actividad de alfa amilasa.

Se determinó en las aleuronas incubadas en ausencia y presencia de $50_3 \times 10^{-6}$ M por diferentes períodos de tiempo (0-25 h) ver sec. 2.8.1, según método de Christophs y Varner (84), que consiste en medir la disminución del complejo almidón-yodo debido a la degradación del almidón, en función de la actividad de la alfa amilasa y del tiempo de incubación.

Reactivo:

(a) Sustrato: 0.125 g de almidón soluble se suspendieron en 100 ml de buffer ($(NH_4)_2PO_4$ 50 mM y $CaCl_2$ 10 mM); la solución anterior se lleva a ebullición por 1 min., dejándose enfriar a temperatura ambiente y centrifugando posteriormente a 300 rpm, el sobrenadante se utilizó como sustrato para el ensayo enzimático. La solución de almidón se preparó el día del ensayo.

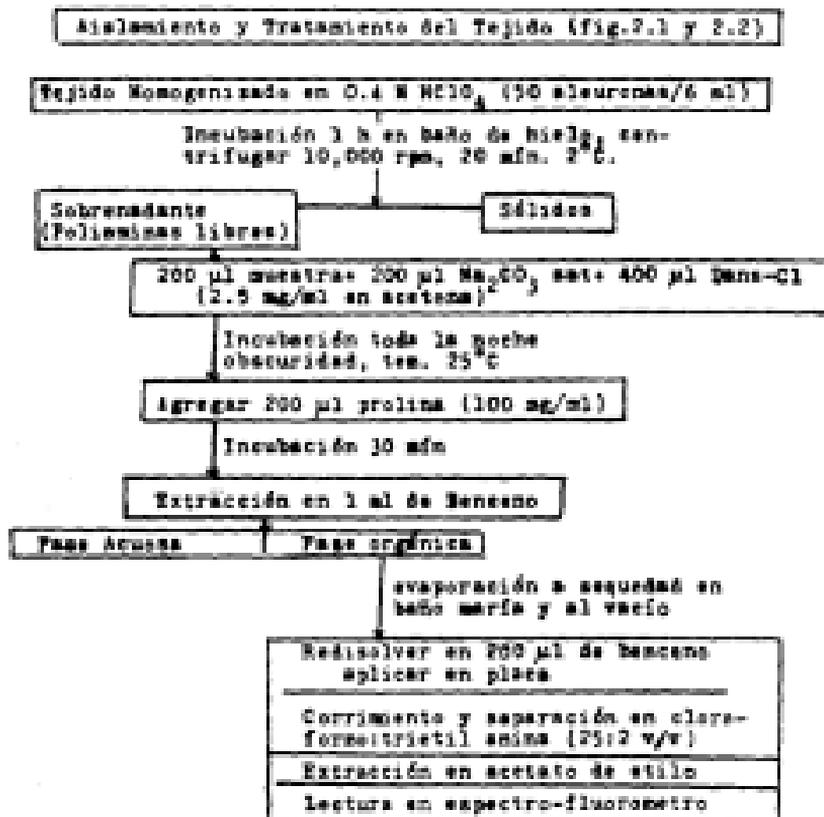


FIGURA 2.6 Diagrama que muestra la extracción y ensayo de las polisemas Put, Spd y Spa de cepas de aleuronas.

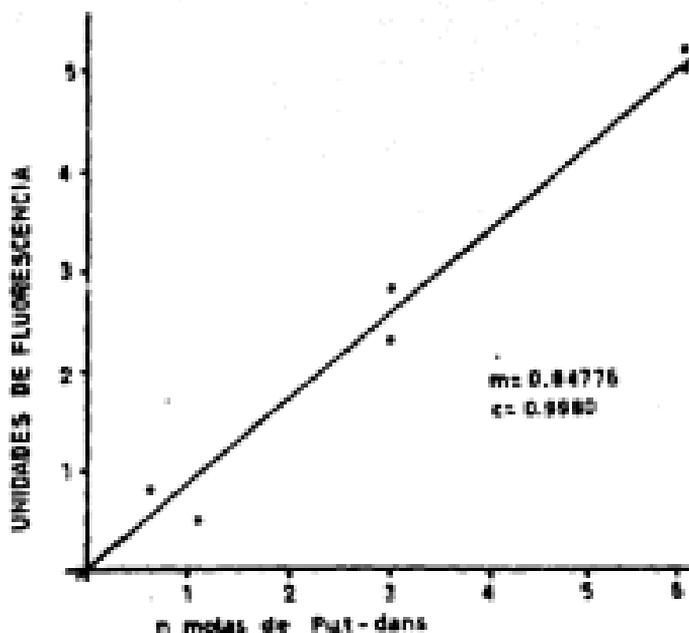


FIGURA 2.7 CURVA PATRON DE PUTRESCINA BANSILADA.

Para la determinación de los puntos de la curva se utilizaron 15 μ l de Put-dans 0.1M como estándar. Ver material y métodos.

λ em: 480 nm Spectrofluorometer SPF-500

λ exc: 350 nm PERKIN-ELMER.

m= pendiente de la recta; r= factor de correlación

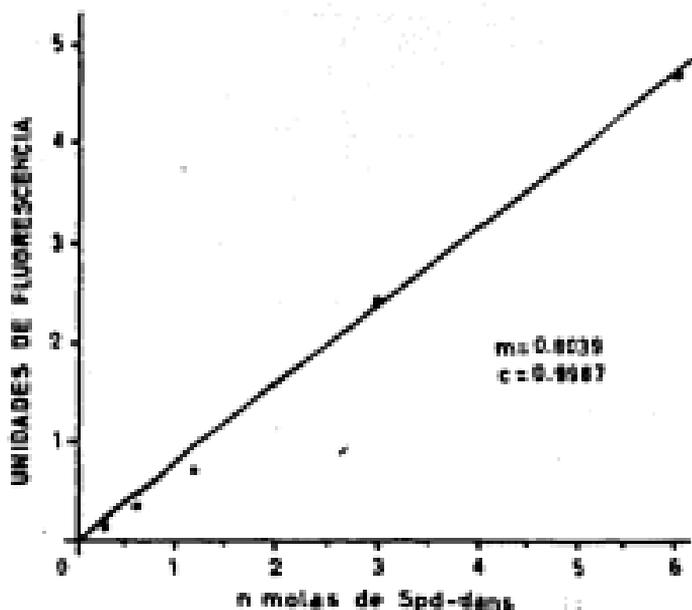


FIGURA 2.8 CURVA PATRON DE SPERMIDINA DANSELADA.

Los puntos de la curva se determinaron colg
casi diferentes cantidades de Spd-dans de un
estándar de 1500 nmolas de Spd-dans (15 μ l de
Spd-dans 0.1M). Ver material y métodos.

λ ex: 480 nm Spectrofluorometer SFF-500

λ em: 350 nm PERKIN-SINGER

m = pendiente de la recta; c = factor de correlación

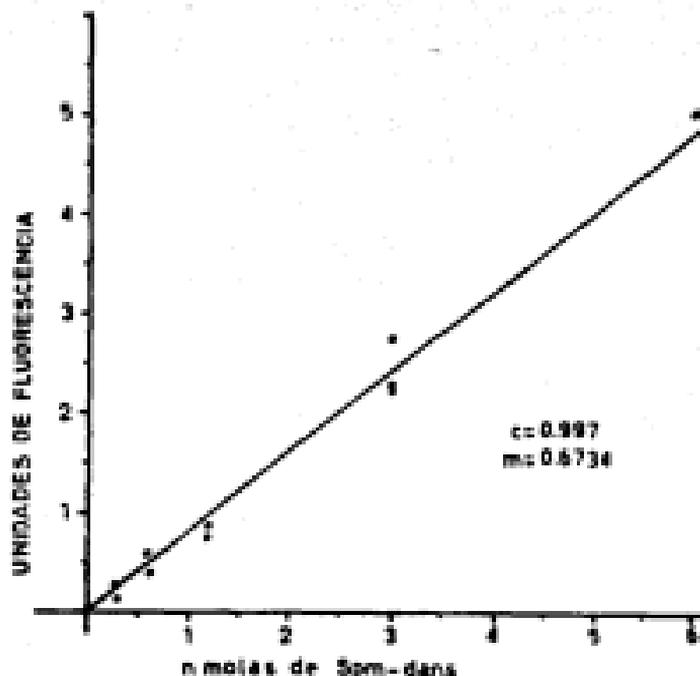


FIGURA 2.9 CURVA PATRON DE SPERMINA BANSILADA

Los puntos de la curva se determinaron escogiendo diferentes cantidades de Sperm-dans de un estándar de 1500 nmolas de Sperm-dans (15 μ l de Sperm-dans 0.1 M). Ver material y métodos.

λ em: 480 nm Spectrofluorometer SPF-500

λ exc: 350 nm PERKIN-ELMER

m pendiente de la recta; r factor de correlación

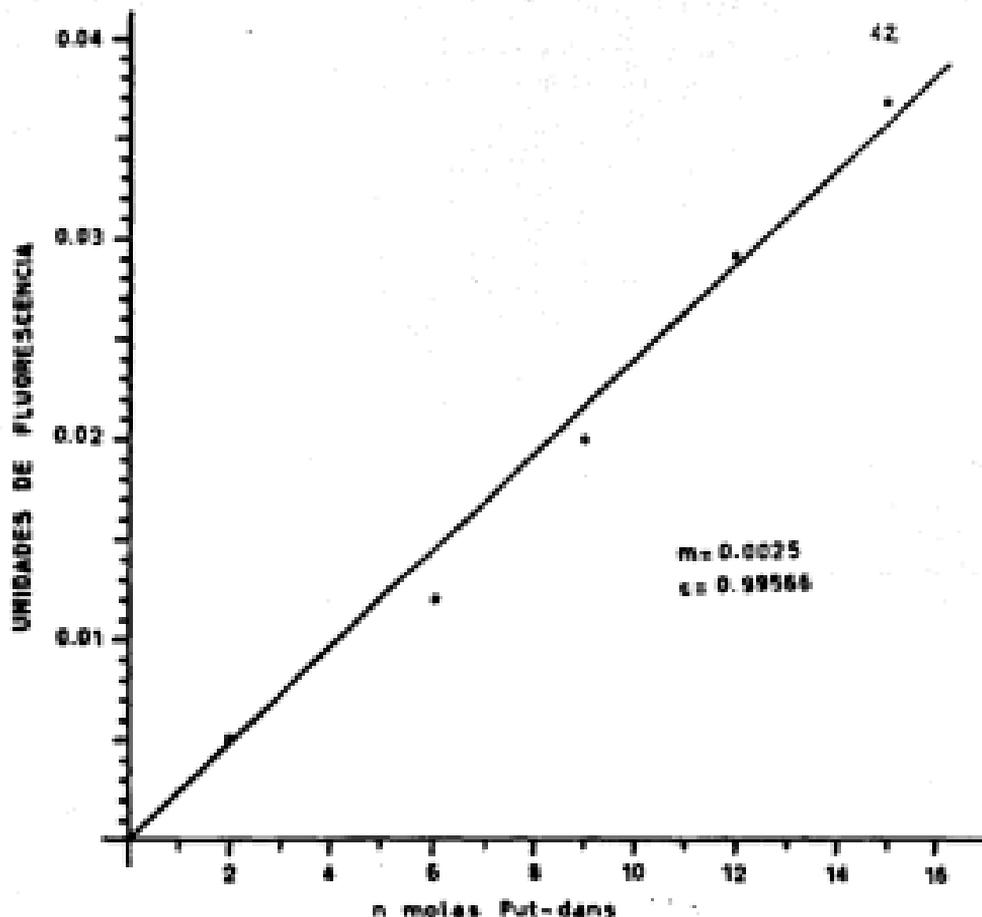


FIGURA 2.10 CURVA PATRON DE PUTRESCINA DANSIDADA

Los puntos de la curva se determinaron colocando diferentes cantidades de Put-dans de un estándar de 1500 nmoles de Put-dans (15 μ l de Put-dans 0.1 M) Ver material y métodos.

λ em: 451 Fluorómetro Teico

λ exc: 366

m: pendiente de la recta; r: factor de correlación

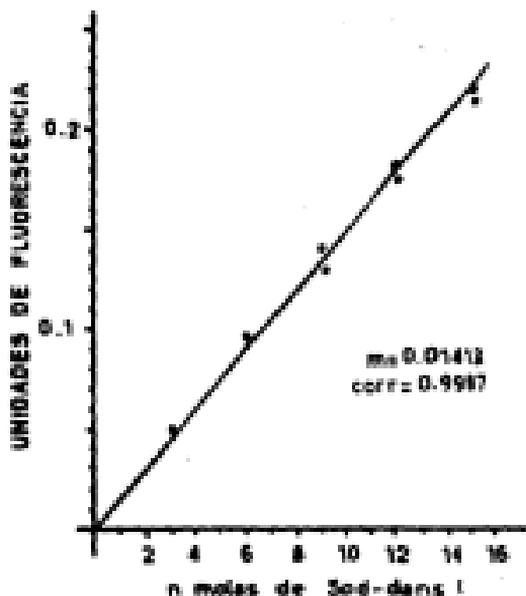


FIGURA 2-11 CURVA PATRON DE SPERMIDINA DANZILADA.

Los puntos de la curva se determinaron colocando diferentes cantidades de Spd-dans de un estándar de 1500 moles de Spd-dans (15 μ l de - Spd-dans 0.1M). Ver material y métodos.

λ em: 451 Fluorometro Zeiss

λ exc: 366

m = pendiente de la recta; cc factor de correlación

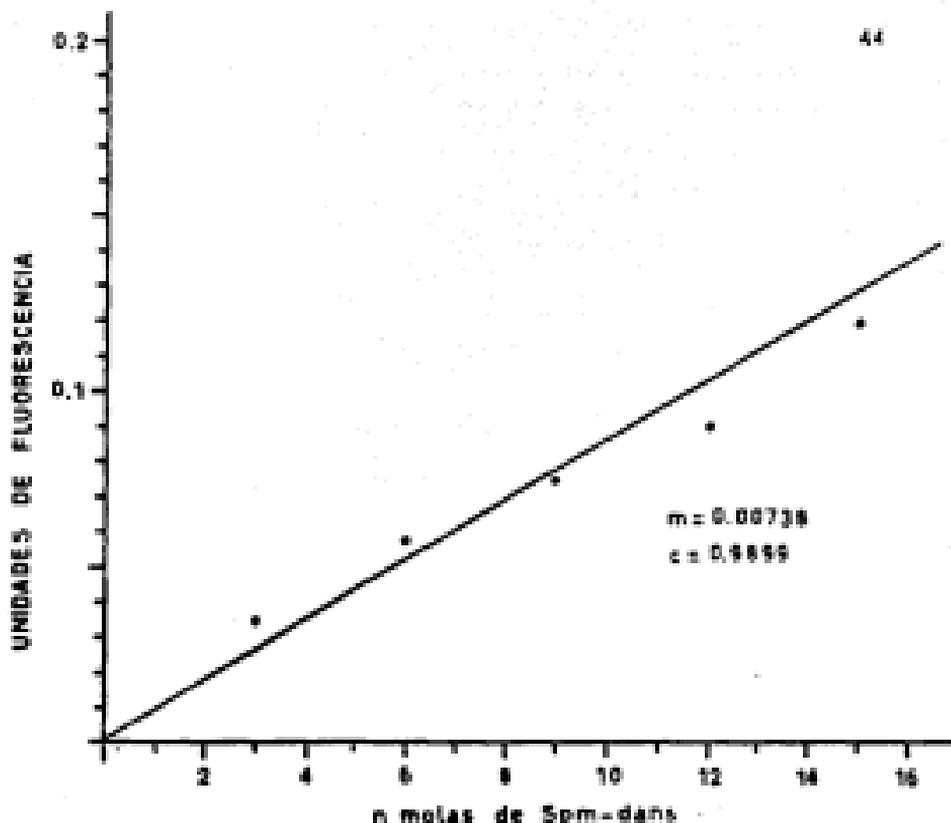


FIGURA 2.12 CURVA PATRON DE SPERMINA DANILADA.

Los puntos de la curva se determinaron colocando diferentes cantidades de Sperm-dans de un estándar de 1500 moles de Sperm-dans (15 μ l de Sperm-dans 0.1M). Ver material y métodos.

λ em: 451 Fluorómetro Seisc

λ exc: 365

m: pendiente de la recta; r: factor de correlación

11.10.1 Obtención del extracto para determinar la actividad de alfa amilasa.

Lotés de 10 aleuronas incubadas en ausencia o presencia de Ag_2 , seco P.L.L. por diferentes períodos de tiempo, se homogeneizaron en un mortero con arena de mar (S.L. Lerck) y 2 ml de NaCl. El homogenizado se transfiere a un tubo de centrifuga que contenía 1 los 2 ml del medio en el cual se realizó la incubación del tejido (alfa amilasa total). El homogenizado se calentó a 70°C por 30 min., para inactivar a la beta amilasa, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm x 10 min a temperatura $2-4^\circ\text{C}$, se desechó la pastilla y el sobrenadante se le denominó extracto de la muestra respectiva, (fig. 8.1).

11.10.2 Ensayo enzimático de alfa amilasa.

En tubos de 12 x 130 mm se colocaron 0.5 ml de la solución de almidón, 3.5 ml de agua bidestilada y 2 ml de solución Yodo-Yoduro de Potasio (1:100), se leyó a 620 nm contra un blanco que contenía 4 ml de agua bidestilada y 2 ml de la solución de I_2/KI . Este es el blanco de reacción a la máxima cantidad de complejo Yodo-almidón formado.

Si la absorbancia a 620 nm es menor que la unidad se aumentó la cantidad de almidón, el volumen de la solución de almidón más agua debe ser igual a cuatro, si es mayor que la unidad, se disminuyó la cantidad de almidón.

A 0.5 ml de almidón (sustrato) se le agregó 100 μl del extracto enzimático, se dejó incubar a temperatura ambiente por una unidad de tiempo (1 min).

La reacción se finalizó adicionando 2 ml de la solución I_2/KI y 3.5 ml de agua bidestilada. Se leyó la absorbancia a 620 nm contra un blanco preparado con 2 ml de I_2/KI más 4 ml de agua bidestilada.

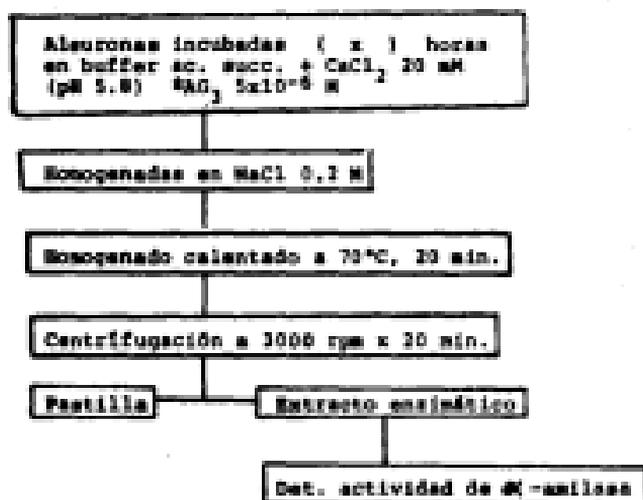


Figura 2.13 Fases seguidas para la medición de actividad de α -amilasa inducida 1 AG, a diferentes tiempos de incubación para semillas control y deterioro.

En general, se tiene un mejor cumplimiento de la ley de Beer en el rango de absorbancia entre 0.4-0.7, por tanto se procuró que el rango de absorbancia para el ensayo empírico estuviera dentro de este, a 620 nm.

La actividad de la enzima se calculó de la siguiente forma:

A_{Dco} : Absorbancia del blanco

A_m : Absorbancia de la muestra

Δ D.O. : Cambio de densidad óptica

$$A_{Dco} - A_m = \Delta \text{ D. O.}$$

ACTIVIDAD DE ALFA AMILASA =

$$\frac{\Delta \text{ D.O. } \times \text{ vol. total}}{\text{Cantidad ensayada (ml)}} \times 6 = \text{ACTIVIDAD DE ALFA AMILASA}$$

El número 6 resulta del volumen (ml) total del ensayo de alfa amilasa.

Se definió la unidad de alfa amilasa como la cantidad de enzima que provoca un cambio de densidad óptica de una unidad de absorbancia por minuto a una longitud de onda de 620 nm.

• No dejaremos de explorar
y al final de toda nuestra investigación
habremos llegado a donde comenzamos
Y conoceremos el lugar por vez primera
...
Cuando las lenguas de fuego se pliegan
Para formar un nido de fuego
Y el fuego y la rosa sean sólo uno. "

T. S. Eliot, *Four Quartets*.

III.- RESULTADOS.

III.1 Efecto del tiempo de incubación del tejido sobre los niveles de Poliaminas.

La incubación por diferentes períodos de tiempo de aleurona en buffer sin fitorreguladores modifica los niveles de poliaminas solubles en ácido perclórico (PClO_4) fig. 3.1.

Durante las primeras 2 h de incubación los niveles de espermina aumentan visiblemente con respecto a 0 h mientras que, los niveles de putrescina y espermidina tienden a permanecer constantes. Después de este tiempo los contenidos de las poliaminas aquí estudiadas presentan la misma tendencia: Entre las 2 y 8 h de incubación su concentración disminuye en el tejido y luego se mantiene constante por el resto del tiempo estudiado.

III.2 Efecto de ácido Giberelico (AG_3) en los niveles de poliaminas en capa de aleurona de cebada.

El efecto del ácido giberelico en los niveles de poliaminas se determinó comparando el patrón de poliaminas obtenido en presencia de AG_3 con el obtenido en su ausencia, comparar fig. 3.3 y 3.5.

Durante las primeras 8 h de tratamiento el AG_3 no afecta ni el nivel ni el patrón de la Spm con respecto al control, sin embargo, a partir de este momento se observa un nuevo pico de esta poliamina que tiene su máximo a las 16 h después de iniciada la incubación y luego decae hasta niveles similares a los presentados por el tejido a las 8 h de tratamiento. Por su parte la Spd sólo sufre cambios cuantitativos cuando el tejido se trata con el fitorregulador, fig. 3.3.

Otra forma de visualizar el efecto de AG_3 en los niveles de cada una de las poliaminas es através de calcular la relación ^a

^a Contenido: P_i en presencia de AG_3 dividido entre el contenido de la misma P_i en ausencia del fitorregulador $\frac{+AG_3}{-AG_3}$

cada uno de los tiempos de tratamiento; si la relación es 1.0 significa que el AG_3 no modifica el nivel de poliaminas, si es mayor que la unidad el AG_3 aumenta los niveles para esas poliaminas, mientras que si la relación es menor que la unidad, se interpreta como que AG_3 disminuye el contenido de poliaminas con respecto al control. Al efectuar este tipo de cálculos y graficarlos, fig. 3.3, se observa claramente que el AG_3 disminuye ligeramente los niveles de Put en el tejido, mientras que los niveles de Esp se aumentan notablemente durante las primeras 2 h de tratamiento.

Apartir de este momento el AG_3 disminuye los niveles de dichas poliaminas; la disminución es más rápida de las 2h a las 6 h de tratamiento que de las 6 a las 24 h.

Estos resultados sugieren que el AG_3 modifica los niveles de las poliaminas más abundantes en aleurona de cebada aislada, y que el mayor efecto es a nivel de Esp, lo cual aumenta en forma transiente a las 2 y 6 h.

III.3 Niveles de poliaminas en aleuronas aisladas de semillas deterioradas.

Para estudiar si existía una relación entre el metabolismo de las poliaminas y la respuesta funcional de tejido al AG_3 , síntesis de alfa amilasa, lo que se hizo fue determinar el efecto de AG_3 en aleuronas aisladas de semillas de cebada de bajo vigor o deterioradas.

Datos en la literatura y los de la fig. 3.4 demuestran que la capacidad de síntesis de alfa-amilasa por la aleurona aislada de semillas deterioradas, está disminuida con respecto al control aún cuando en ambos casos la capacidad de síntesis de proteínas es similar(87). Con estos antecedentes se da a entender que los cambios en los niveles de poliaminas inducidos por AG_3 en aleuronas deterioradas son de menor magnitud y/o diferentes de las que induce en el tejido control ya que el mecanismo de respuesta al AG_3 se encuentra dañado en la aleurona de bajo vigor (87).

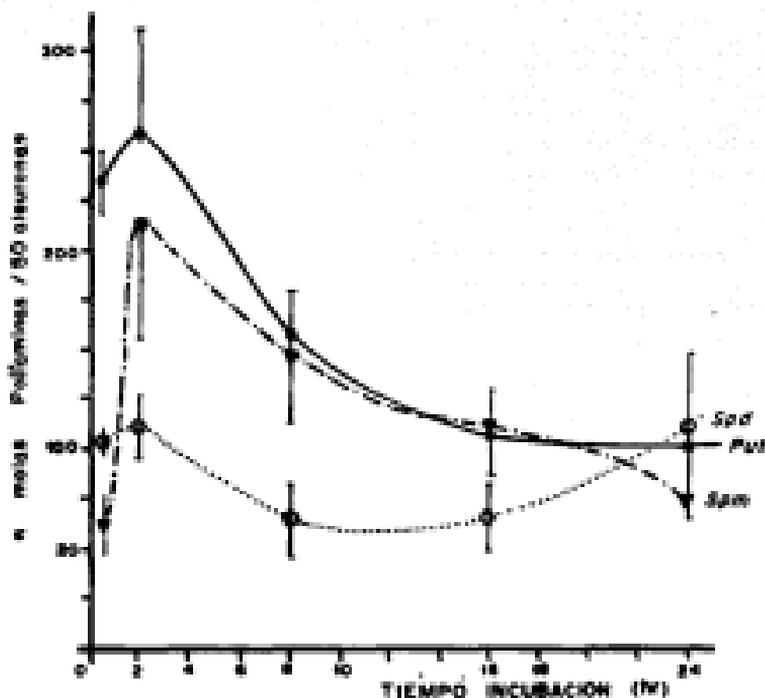


FIGURA 3.1 EFECTO DE TIEMPO DE INCUBACION EN LOS NIVELES DE POLIAMINAS EN CAPA DE ALEURONA DE SEMILLAS CONTROL.

Cada punto es el promedio de cuando menos tres experimentos. Detector: Spectrofluorometro SF-500

λ em: 480 nm ; λ exc: 350 nm

Las barras representan \pm la D.S.

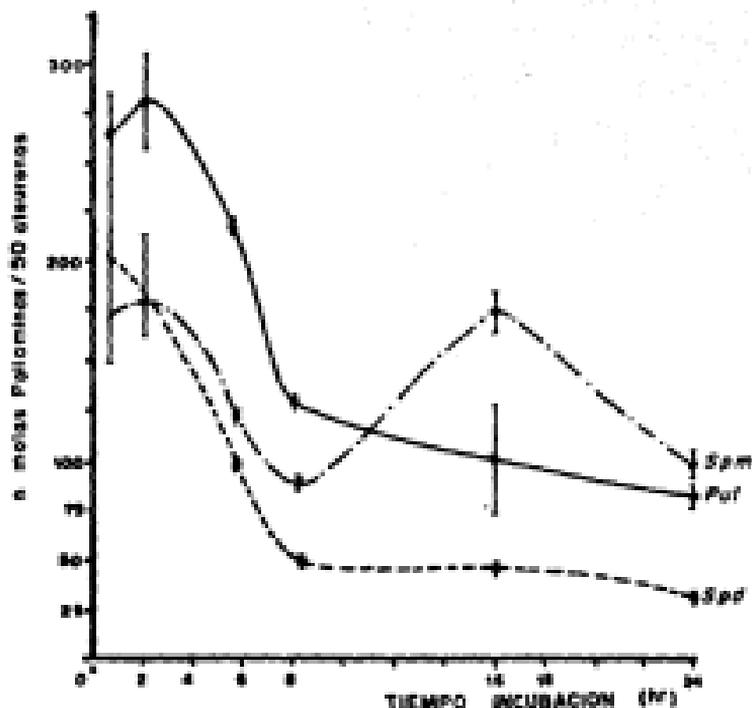


FIGURA 3.2 EFECTO DE Ag_3 EN LOS NIVELES DE POLIAMINAS EN CAPA DE ALEURONA DE SEMILLAS CONTROL.

50 aleuronas se incubaron en presencia de Ag_3 $5 \times 10^{-6} M$.
 Detector: Spectrofluorometer PERKIN ELMER. λ em: 480 nm
 λ exc: 350 nm.

Cada punto es el promedio de cuanda menos 3 experimentos.
 Las barras representan \pm la D.S.

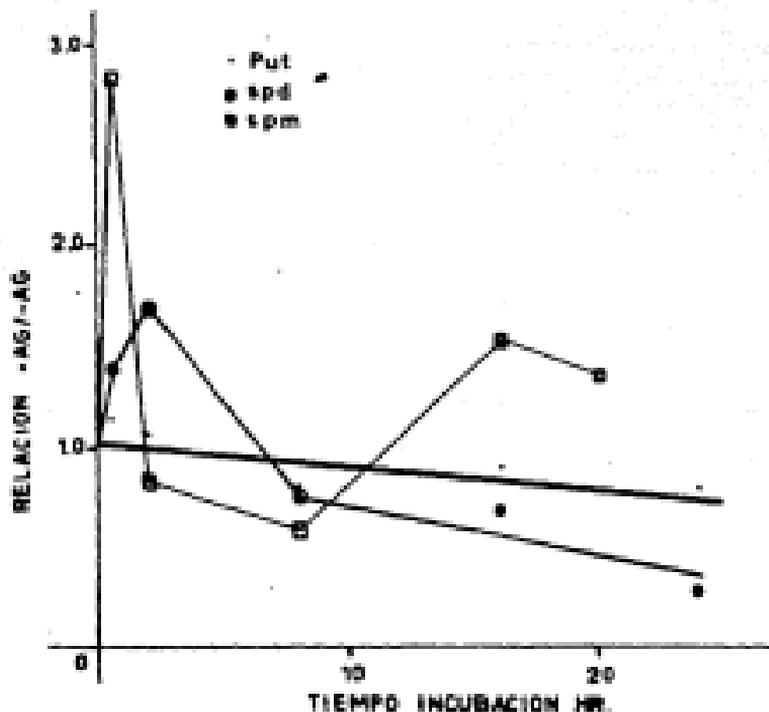


FIGURA 3.3 RELACION - EFECTO DEL AG₂ EN LOS NIVELES DE POLIAMINAS PARA ALEURONAS CONTROL.

Una relación de +AG/-AG mayor a 1 implica que AG aumenta los niveles de poliaminas.

Una relación igual a 1 implica que no hay efecto.

Una relación de +AG/-AG menor a 1 implica que AG disminuye los niveles de poliaminas.

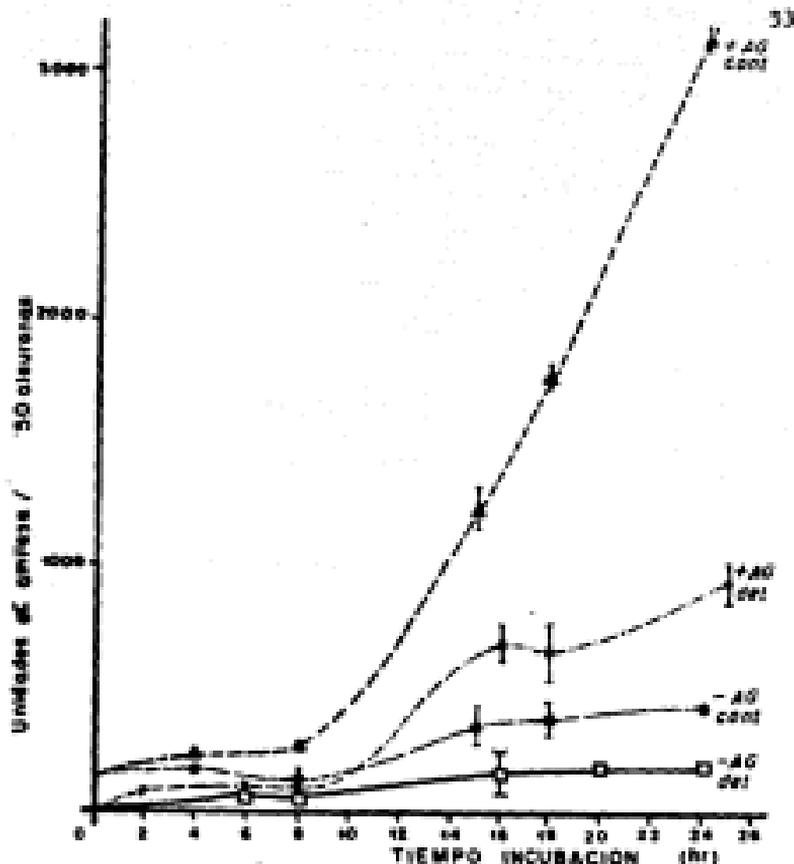


FIGURA 3.4 EFECTO DE Ag_3 EN LA ACTIVIDAD DE ALFA AMILASA.

50 capas de aleurona de cebada de semillas control y de terciada inhibidas por 12 hrs. se incubaron en presencia y ausencia de Ag_3 $5 \times 10^{-6} M$. Cada punto representa la actividad amilolítica del sobrenadante más extracto del tallo y es el promedio de cuando menos 2 experimentos. Las barras representan \pm la D.S.

Los cambios en los niveles de polianilinas inducidas por la incubación del tejido aislado de semillas de bajo vigor con diferentes de los inducidos en el tejido control, comparar fig 3.3 y 3.4; Los niveles de Put disminuyen en la aleurona deteriorada con niveles mayores que los que presenta el control a diferencia de los niveles de Spd y Spm que se encuentran disminuidos con respecto al control, sólo más el aumento en Spm observado a las 2 h de incubación en el control no se presenta en las aleuronas deterioradas.

III.4 Efecto de ácido Giberélico (AG_3) en los niveles de polianilinas en aleuronas deterioradas.

El AG_3 no modifica los niveles de Put libre en aleuronas aisladas de semillas de cebada deteriorada, comparar fig. 3.5 y 3.6, sin embargo los niveles de Spm y Spd en las 2 primeras horas de incubación aumentan con respecto al control a las 0.5 h de tratamiento, fig. 3.6, ó con los niveles que presenta el tejido de bajo vigor incubado sin AG_3 , fig. 3.5 y 3.6. En aleuronas deterioradas el nivel total de Spm y Spd es siempre menor que el encontrado en aleuronas control, sólo más en las primeras el AG_3 no aumenta los niveles de Spm observados en el tejido control entre las 8 y 16 h de incubación, comparar fig. 3.7 y 3.8.

III.5 Efecto de ácido Absisico (ABA) en los niveles de polianilinas en aleuronas.

Otra forma de demostrar que el aumento de polianilinas inducido por AG_3 en aleuronas son parte del mecanismo de acción de este fitorregulador es, estudiando si el ABA lo inhibe, ya que el ABA es un antagonista de la acción del AG_3 . Por dificultades técnicas este tipo de experimentos no se pudo realizar en aleuronas aisladas de semillas control o de alto vigor, por lo que sólo se presentan los datos obtenidos en aleuronas de bajo vigor o deterioradas, fig 3.7 y 3.8. El tratamiento del tejido con ABA resulta en cambios cuantitativos y cualitativos en el patrón de Put, fig. 3.7, curva

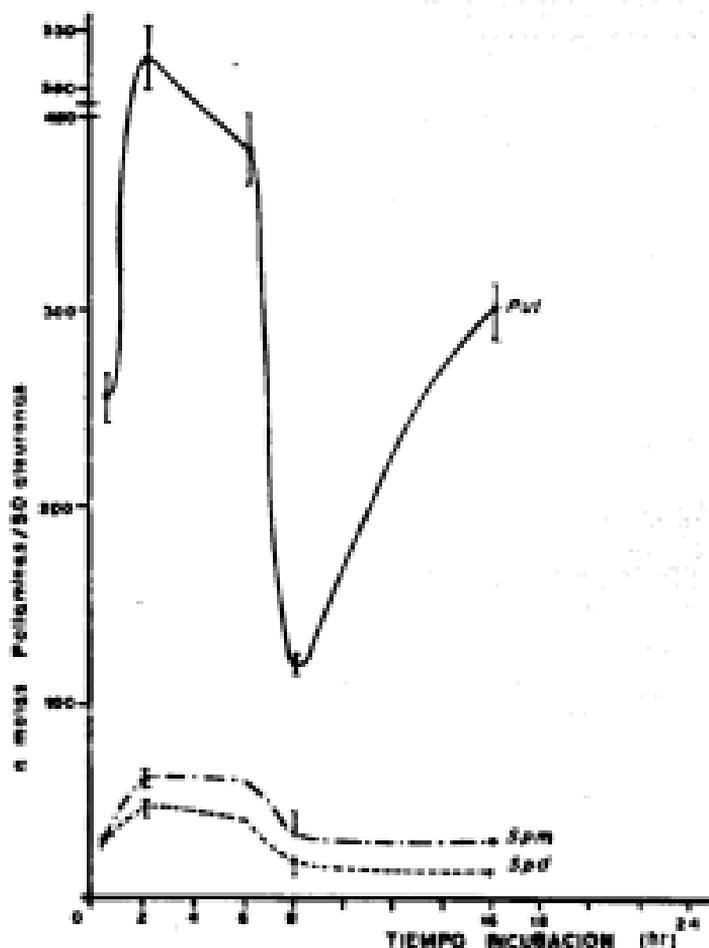


FIGURA 3-5 NIVELES DE POLIAMINAS EN CAPA DE ALBUMINA DE CEMBA DE SEMILLAS DEVIORADAS.

Cada punto es el promedio de cuando menos tres experimentos, las barras representan \pm la D.S.

Detector: Fluorometro Teiss

λ em: 451 λ exc: 366 nm

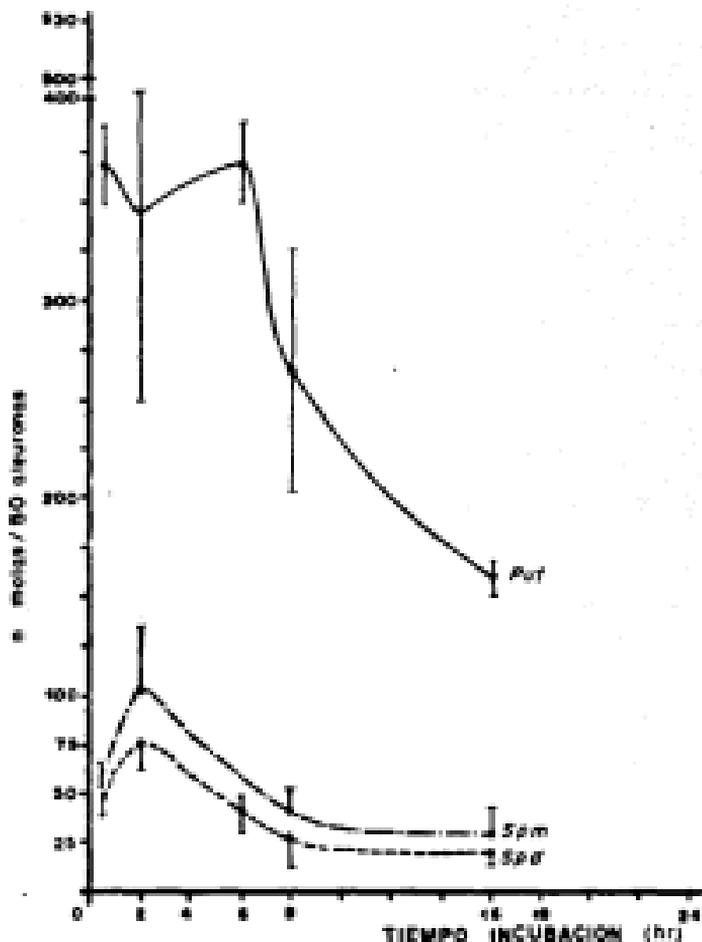


FIGURA 3.4 EFECTO DE Ag_3 EN LOS NIVELES DE POLIAMINAS

EN CAPA DE ALIUVIUM DE SEMILLAS DEGRADADAS.

50 aleurones se incubaron en presencia de $Ag_3 \cdot 5 \times 10^{-6} M$.

Detector: Fluorómetro Zeiss. λ em: 450 nm ; λ exc: 366 nm

Cada punto es el promedio de cuando menos tres experimentos. Las barras representan \pm la D.S.

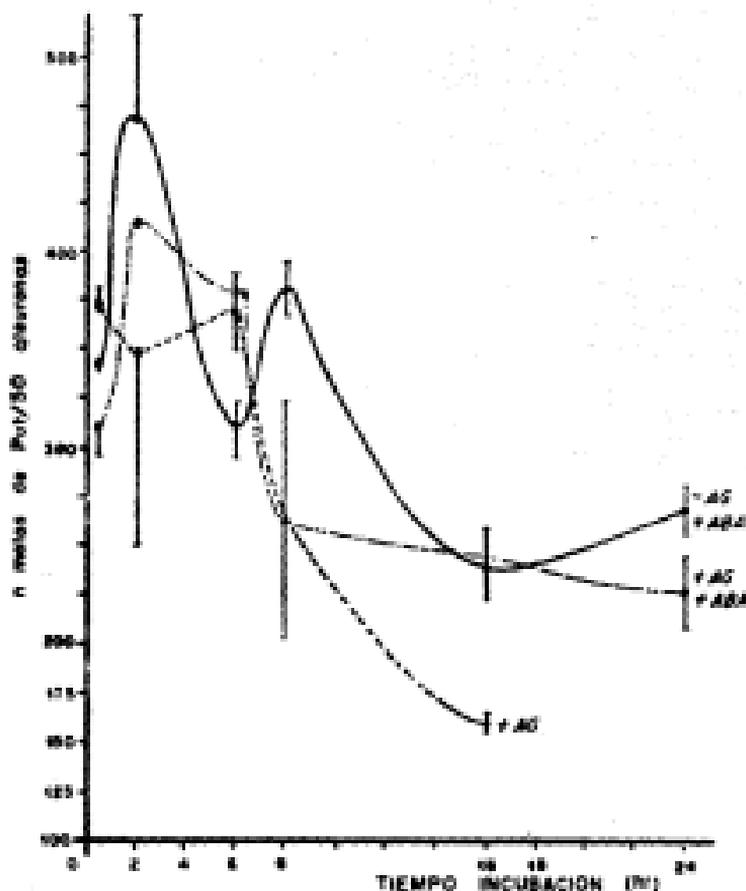


FIGURA 3.7 EFECTO DE ABA EN LOS NIVELES DE PUTRESCINA EN ALEURONAS DETERIORADAS.

Se muestra el efecto de ABA en los niveles de Put en aleuronas deterioradas respecto a aleuronas incubadas en presencia de AG₃. 50 aleuronas fueron incubadas en presencia de los respectivos fitorreguladores. Ver material y métodos. Detector: Fluorómetro Zeiss

λ em: 452 nm ; λ exc: 366 nm

Las barras representan \pm la D.S.

-AG + ABA, con respecto a los inducidos por AG, fig. 1.7, curva - +AG.

Estos resultados sugieren que cada fitorregulador modifica en forma distinta el metabolismo de poliaminas y que cuando ambos están presentes los cambios que ocurren en el tejido y metabolismo de estos compuestos es intermedio que da cada uno de ellos por separado, fig. 1.7, +AG + ABA.

Los niveles de Spd y Spm no se ven modificados por ABA. El hecho de que en tejido deteriorado los niveles de poliaminas no sufra modificaciones considerables por los tratamientos utilizados sugiere que el mecanismo por medio del cual el AG₁ modifica sus niveles, probablemente se encuentra dañado, comparar fig. 1.2, 1.6 y 1.8.

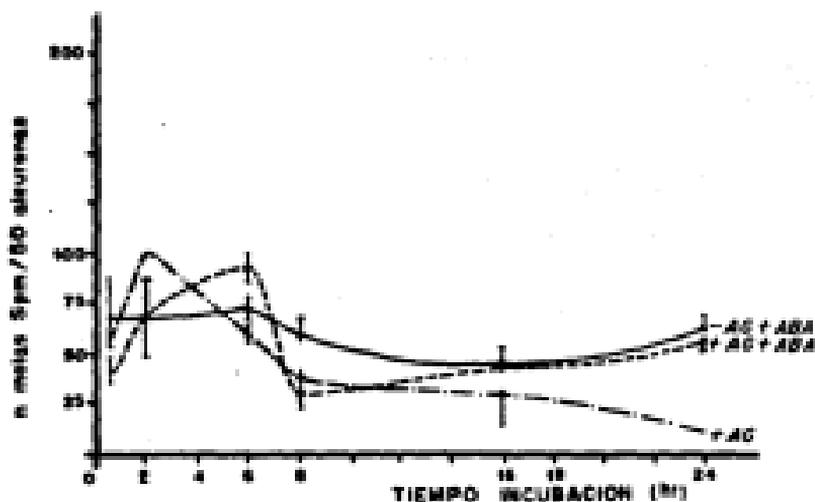
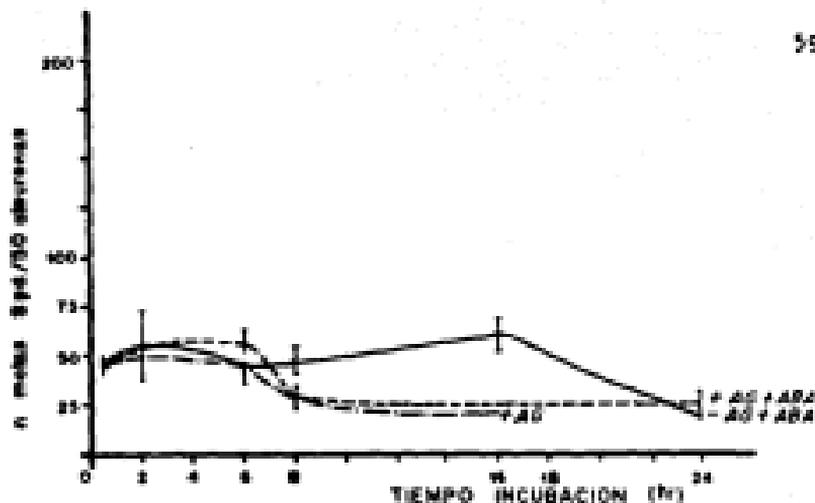


FIGURA 3.6 EFECTO DE ABA EN LOS NIVELES DE SPERMIDINA Y SPERMINA EN OOCITOS DEGRADADOS.

50 oocitos fueron incubados en presencia de los respectivos fito reguladores, la determinación e incubación se describe en material y métodos. Cada punto es el promedio de cuando menos tres experimentos. Las barras representan \pm la D.S.

" Es poco lo que se ha hecho, escasamente un inicio; y sin embargo, es mucho comparado con el vacío total de hace un siglo. Y nuestros conocimientos, como puede intuirse fácilmente, parecerán a su vez la ignorancia más supina a aquellos que vengan detrás nuestro. Sin embargo, no cabe despreciarlos pues a través de ellos nos acercamos a tientas hasta alcanzar la orilla de la vestidura del altísimo."

Agnes F. Clarke

(A popular History of Astronomy)

4.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

Este trabajo se realizó con el propósito de determinar si las modificaciones en los niveles de poliaminas que acompañan al efecto de fitorreguladores son parte del mecanismo de acción del mismo ó tan solo consecuencia de una activación inespecífica del metabolismo general de la célula estudiada.

El sistema que se escogió para este estudio fue la capa de aleurona de cereales, tomada en particular, es un tejido que no crece, ni se divide y está formado por un solo tipo de células. Estas características eliminan los inconvenientes que presentan los estudios hechos por ejemplo en hongo, coleóptilo o en celulo, donde el tipo y edad de las células que constituyen el tejido son diversas. Además, son tejidos que se dividen y crecen, se ha demostrado que dependiendo del estado metabólico de una célula es el nivel de poliamina que presenta (2,8).

Otra ventaja de la aleurona es que constituye el tejido blanco del AG_3 . Este fitorregulador induce síntesis de ácido de alfa amilasa que se inhibe por la acción del ácido abscísico (ABA), otro fitorregulador natural.

El hecho que el sistema modelo responda a un inductor y un antagonista permite delucidar si los cambios observados en los niveles de poliaminas se deben a la acción específica del AG_3 ó suceden en forma paralela, pero sin estar involucrados en la acción del mismo.

Los niveles de poliaminas en la aleurona se modifican por efecto de la incubación (fig. 3.1 y 3.2). Independientemente si el tejido es control de semillas control o deteriorado (fig. 3.5); - Los cambios más bruscos se observan en los primeros 8 h de incubación, donde el cambio principal es en Put.

Al comparar la respuesta del tejido deteriorado con el control (fig 3.5 y fig. 3.1), se observó un segundo incremento después de las 8h. Estos cambios en el tejido en las primeras 8 h de ig

ubicación pueden deberse a que la aleurona reajusta su metabolismo. La aleurona forma parte de la media scutella, el ambiente que siente por la car. interna es el endospermo, que ejerce una gran fuerza osmótica, por poca presión osmótica (o potencial de presión), a mientras que cuando se sienta ya no siente el potencial osmótico, — sino mucha presión osmótica (o potencial de presión) (buffer de — de Succinato-CaCl₂ 20 mM o/u).

O bien, a un cambio de pH en las inmediaciones de la aleurona, esto es, el pH que siente la aleurona en la media scutella es — aproximadamente de 4.5 (86), mientras que el de incubación es de 5-8, por tanto, podría estar sufriendo un estrés de pH, se ha reportado un comportamiento similar, en protoplastos de avena e tejido de de cebada al ser incubados a pH menores de 6 con aumento en sus niveles de polifenoles (2,8).

La respuesta diferente de la aleurona deteriorada respecto a la control (fig. 3.1 y fig 3.5) después de las 8 h de incubación, aumento de Put y disminución de Spd y Spm, podría deberse a el metabolismo de estas dos últimas hacia la primera. Para demostrarlo, sería necesario cuantificar la actividad de la enzima encargada de esta degradación, una poliaminoxidasa (PAO) en estos sistemas. Como es sabido a medida que la semilla se deteriora se presentan diversos cambios bioquímicos, uno de ellos es el de cambiar la permeabilidad membranal de las células que constituyen el tejido de la semilla (27), a 1 vez a esto se debe la respuesta encontrada en poliaminas.

Cuando el tejido control se incubó con AG₁, lo más sobresaliente es el efecto que el fitoregulador tiene sobre los niveles de Spm los cuales aumentan a partir de las 8 h y se mantienen constantes para todo el periodo estudiado (fig. 3.3). Durante tal periodo el fitoregulador está teniendo efecto en la transcripción del ARN de alfa amilasa, uno de los efectos del fitoregulador en este tejido. Los resultados anteriores indican que la Spm podría estar involucrada, al igual que en otros sistemas, en la fidelidad y/o eficiencia de la lectura del ARN de alfa amilasa.

En cada uno de los experimentos con ABA se realizaban en tejido de tioriorado y se puede concluir: El ABA incrementa los niveles de Put y Spd, principalmente después de las 8 h de incubación para Put y 16 para Spd, además de mostrar un efecto antagónico al de AG_3 - fig. 1.5 y 1.8, esto se observa mejor al comparar ABA-ABA con respecto a AG_3 .

De los resultados anteriores puede concluirse que la adición de AG_3 y ABA a la aleurona, ya sea separadas o juntas, modifica los niveles de poliaminas, el primero especialmente en aumentar Spm, si se trata de tejido control, y de disminuir los niveles de Put para aleuronas Deterioradas y Control, fig. 1.3 y comparar fig 1.5 y 1.6 .

Se ha reportado que el 60% de la proteína sintetizada por el tejido 16 h después de incubar con AG_3 se cifra amilasa con respecto al control, lo cual indica que debe existir un mecanismo para redirigir la maquinaria de síntesis de proteínas y probablemente la Spm este participando en este sistema al igual que se ha reportado para otros sistemas in vitro (2,8).

El aumento de Spm por AG_3 en semillas control a las 16 h coincide con una ligera disminución de las otras dos amíneas, fig.1.3 esto sugiere que posiblemente haya una conversión de Put y Spd hacia Spm. Para lo cual se tendría que cuantificar las enzimas involucradas en este metabolismo de poliaminas.

En aleuronas deterioradas tratadas con AG_3 , no existe efecto sobre Spd y Spm a lo largo del tratamiento, pero sí una notable disminución en Put, después de las 8 h de incubación, fig. 1.5 y 1.6. El hecho que las aleuronas deterioradas y control respondan de manera diferente a la acción de AG_3 , principalmente en Spd y Spm fig 1.3 y 1.6, podría estar reflejando la incapacidad que tiene la aleurona para sintetizar con poca eficiencia la alfa amilasa, fig. 1.4. Para verificarlo, sería necesario compensar esta deficiencia de poliaminas de manera exigua y cuantificar la respuesta en vivo. Ahora bien, para demostrar que el segundo aumento de Spm era

parte del mecanismo de acción del fitorregulador, se debió haber incubado en A6+ABA, sin embargo, las semillas se deterioraron y no pudieron conseguirse recién cosechadas de la misma variedad.

Recientemente en trigo se ha demostrado que este segundo aumento de Szn efectivamente se ve disminuido por la adición de ABA. El ABA aumenta los niveles de Put y Spd, fig 3.7 y 3.8, revirtiendo la acción de A6, de disminuirlos.

Entonces, podemos decir que el cambio de poliaminas es un efecto interdependiente de la acción de A6₁ (e incluso de ABA) y dependiente de la calidad de la semilla. Probablemente los altos niveles de Put y la relación no adecuada de Szn y Spd, en aleuronas deterioradas, no permitan la síntesis del RNm de alfa amilasa o su traducción.

Por otro lado, Lin (16) ha realizado estudios similares utilizando el sistema presentado en este trabajo, sin embargo, no fue sensible a la acción de fitorreguladores.

Considerando que la calidad de la semilla por él utilizada y la nuestra fue similar (98% viables), pero en condiciones experimentales diferentes, se reprodujeron las unidades de alfa amilasa para ambos sistemas en el curso de este trabajo.

Los resultados y diferencias experimentales se muestran en la tabla 4.1.

La respuesta del tejido en la síntesis de alfa amilasa concuerda con lo reportado por el autor, pero es 7 veces menor que la obtenida en este trabajo. Esto puede deberse a dos factores:

- (1) Capacidad de oxigenación: Resultados en el laboratorio muestran que cuando aleuronas de trigo se incuban sin agitación, el medio se alcaliniza (datos no publicados) y no existe igual respuesta a sintetizar alfa-amilasa.
- (2) pH de inducción: Datos en la literatura (28) muestran que cuando aleuronas de trigo se incuban a pH=5 se obtiene mayor cantidad de alfa amilasa que a pH=6, esto no concuerda con los datos obtenidos por Lin, lo que viene a reafirmar que posiblemente exista una diferencia de oxígeno.

	Lin, F.F.C.	Aleuronas Control
Tiempo incubación	2-4 días	3 días
Núm. de aleuronas incubadas	20	50
Vol (ml) de incu- bación	2	10
pH del Buffer de incubación	5.0	5.8
u. alfa-amilasa	444.825 ± 23.19	140 ± 3
relación +AG/-AG	2	7.36
Cuantificación de Polisac. Comp. Fluorescentes.	Desalados HPLC	Desalados Cromatografía capé fina.

Tabla 4.1. Principales condiciones y resultados experimen-
tales para dos inducciones diferentes, utili-
zando el mismo sistema.

Las aleuronas control indican que se utilizaron
las condiciones reportadas en este trabajo, mien-
tras que Lin, F.F.C. indica que son las que utilizó
este autor.

La ruta biosintética de poliaminas requiere de oxígeno de forma indirecta, ya que su metabolismo necesita ATP, en especial la S-ADDC (8), enzima que da paso a la formación de Spd y Spa vía putrescina a S-adenosil metionina. Una deficiencia de oxígeno podría ser una limitante en la ruta biosintética de estas poliaminas.

De acuerdo a las unidades de alfa-aminoácidos, puede decirse que - las aleuronas de Lin se comportan como las deterioradas de este -- trabajo.

PERSPECTIVAS:

Para continuar con esta línea de investigación se sugiere:

- 1.- Determinar los niveles de PAS cuando las alcuronas se someten a diferentes condiciones de estrés por pH.
- 2.- Determinar si el segundo aumento de Spm en alcuronas control se debe a AO_3 .
- 3.- Determinar la actividad enzimática del metabolismo de PAS (anabolismo y catabolismo) en presencia y ausencia de fitorreguladores, para establecer el nivel en el cual están involucrados.
- 4.- Compensar la deficiencia de PAS en alcurona deteriorada y cuantificar la respuesta enzimática (alfa amilasa).
- 5.- Determinar la influencia que tiene las PAS en la síntesis y traducción del ARNm de alfa amilasa.
- 6.- Determinar la influencia de PAS en las isoenzimas de alfa amilasa.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Smith, A. (1975) Recent Advances in the Biochemistry of plant amine. *Phytochemistry*. 14:889-890
- 2.- Galston, A.W. (1983) Polyamines as Modulator of plant Development. *BioScience*. 33 : 383-88
- 3.- Galston, A.W., Kaur-Sawhney R., Altea, A. and Flores, H. Polyamines, Macromolecular synthesis and the problem of cereal protoplast regeneration. In advances in Protoplast Research. Proc. 5th Int Protoplast Sym Ed. L. Ferenczy G.L. Farkas pp 485-57.
- 4.- Kaur-Sawhney R., Slocum, R.D. and Galston, A.W. (1984) The physiology and Biochemistry of polyamine in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 215 (2):283-303
- 5.- Kaur-Sawhney R. and Galston, A.W. (1982) On the physiological significance of Polyamines in Higher plants. *Plant Growth Substances*. London N.Y. Academic Press.
- 6.- Bernal, L.I. (1983) Poliaminas: moléculas en busca de una función. *Boletín de Educación Biotécnica*. 8 (1):13-18
- 7.- Galston, A.W., Kaur-Sawhney, R. (1980) Polyamines and Plant cells, what's new in plant. *Physiology*. 11:5-8
- 8.- Smith, T.A. (1983) Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34: 117-144
- 9.- Mendes, D.J. & Hicks, J.J. (1983) Metabolismo y función de las poliaminas en las células vegetales. *Rev. Soc. Quím. Mex.* 27 (4) 2-19
- 10 Kaur-Sawhney, R. Bai YR., Galston, A.W (1982). Gibberellic acid of polyamine Biosynthesis in internodes of light-grown dwarf peas. *Plant Physiol.* 69:183-185

- 11.- Bagni, N., Serafini-Fraccassini, D. and Ferragiarini, F. (1980) Polyamines and cellular growth process in higher plants. Plant Growth Substances. London N.Y. Academic 473-82
- 12.- Meisfaj, A. (1985) Las pequeñas juegan un gran papel. La Ciencia en la URSS. No 1:64-70
- 13.- Fujihara, S., Nakashima, T., Kurogochi, Y. (1982) Occurrence of a new polyamine Canavaldina, in the sword bean, *Canavalia gladiata*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107:403-410
- 14.- Bagni, N., Serafini-Fraccassini, D. and Ferragiarini, F. (1982) Polyamine and cellular growth process in higher plants. Plant Growth Substances. London N.Y. Academic 473-82
- 15.- Fernandes, T.A., Kaur-Saahay, R., Ingersoll, R.B. and Galston, A.W. (1985). Correlation between Polyamines and Pyrrolidone alkaloids in developing Tobacco callus. Plant Physiol. 18: 323-26
- 16.- Kaur-Saahay, R., Flores, H.E. and Galston, A.W. (1980) Polyamine induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplast. Plant Physiol. 65:368-71
- 17.- Heller, J.S., Kostomly N., Eyrinkidis, D.A. and Canellakis, E.S. (1983) Regulation of Polyamines Biosynthesis in *Escherichia Coly* by proteins basis. Proc. Natl. Acad. Sci. 80:5281-84.
- 18.- Galston, A.W., Aliman, A. and Kaur Saahay, R. (1978) Polyamines, Ribonuclease and the improvement of oat Leaf Protoplasts. Plant Sciences Letters. 11:69-79
- 19.- Sen, D., Choudhuri, M.M. and Ghosh, B. (1983) Changes in polyamines contents during development and germination of rice seeds. Phytochemistry. 17:1245-1249
- 20.- Villanueva, V.R., Adikha, H.C. and Canters-Soler, A.M. (1978) Changes in Polyamine Concentration during seed Germination. Phytochemistry. 17:1245-49

- 21.- Torriani, P., Serafini-Fraccasini, B. and Bagni, M. (1967) Polyamine Biosynthesis and Effect of Bicyclohexylamine during the cell cycle of *Helianthus tuberosus* Tuber. *Plant Physiol.* 64:145-52
- 22.- Phillips, R., Frase, L.C. and Eason A. Polyamines in relation to cell Division and Xylemogenesis in cultured explants of *Helianthus tuberosus*. Lack of Evidences for Growth-Regulatory action. *Journal of Experimental Botany.* 18(185):164-172.
- 23.-Bagni, M., Calderera, C.M. and Maratti, G. (1967). Spm y Spd . distribution during wheat growth. *Experientia.* 2:139-40
- 24.- Cho, S.C.(1968) Enhancement by Putrescine of Gibberellin induced elongation in hypocotyle of Lettuce seedlings. *Plant cell Physiol.* 24:105-108
- 25.- Srivastava, K.S., Yashii, J.D. and Maik, I.B.(1968) Control of Senescence by polyamines and Guanidines in young and mature Barley Leaves. *Phytochemistry.* 27(10):2131-54
- 26.- Kaur-Sawhney, R., Altman, A. and Galston, A.W.(1978) Dual Mechanisms in polyamine-mediated control of ribonuclease Activity in oat leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 62:138-140
- 27.- Kaur-Sawhney, R., Shih Liv-Mei, Cegrelake, T. and Galston, A.W. (1982) Inhibition of proteinase activity by polyamines. *PIERS - LETTERS* 149(2):345-349
- 28.- Sen, K. and Ghosh Bharati. (1984). Effect of Polyamines on - Ribonuclease activity of rice (*Oryza sativa* L.) *Phytochem.* 23(8):1583-85
- 29.- Maik, B.J. and Srivastava, S.K. (1978). Effect of Polyamines on tissue permeability. *Phytochem.* 17:1865-67
- 30.- Parés-Bricuela, O.A.(1983) Poliaminas y actividad proteolítica en un tejido herido de *Solanum tuberosum*. Tesis de Lic. Fac. de química. UNAM.

- 31.- Srivastava, S.K. Smith, T.A.(1982) The effect of some oligoamines and guanidines on membrane permeability in higher plants. *Phytochemistry*, 21:997-1008
- 32.- Speranza, A., Calzoni, G.L. Bagni, M. (1983). Effect of exogenous polyamines on "in vitro" germination of apple pollen. In pollen: Ecology and Implications for Breeding, mentioned in ref. 8
- 33.- Chapel, M. Tassin, J., Alibert, S.(1984) Electrofusion of - Spermine treated plant protoplasts. *FEBS LETT.* 173:331-36
- 34.- Pistocchi, R. Bagni, M. and Competition among polyamines and between polyamines and inorganic cations. *Plant Physiol.* 80: 556-60
- 35.- Johnson, W.T., and Nordlie, F.C. (1980) *Life Sci.* 26:297-302 mentioned in ref. 2
- 36.- Hong, K., Schuber, I. and Papadajopoulos, D.(1983) Polyamines Biological Modulators of membrane fusion-Biochimica et Biophysica Acta, 732:469-72
- 37.- Riedell, W.A.(1987). Effects of Ca^{2+} and polyamines on Mg^{2+} and K^{+} influx in excised maize roots. *Physiol. Plantarum* 49:299-304
- 38.- Kyriakidis, D. (1983) Effect of plant growth hormones and - polyamines on ornithine decarboxylase activity during the - germination of barley seed. *Physiol. Plant.* 57:449-504
- 39.- Bagni, M., Marcellini, S., Ferragiani, F. (1980). Polyamines storage substances and abscisic acid-like inhibitors during dormancy and very early activation of *Helianthus tuberosus* tuber tissues. *Physiol. Plant.* 49:341-45
- 40.- Serafini-Franceschini, D., Alessandri, M.(1983) Polyamines morphogenesis in *Helianthus tuberosus* explants. *Advances in polyamine Research*, Vol 4. N.Y. Raven pp. 419-26

- 41.- Cho, S. (1981) Effects of cytokinins and several auxinogenic agents on the polyamine content of lettuce cotyledons. *Plant Cell Physiol.* 24:27-32
- 42.- Suresh, M.R., Adiga, P.R.(1979) Diamine oxidase of *Lathyrus sativus* seedlings: Purification and properties. *J. Bio. Sci* 11:109-24
- 43.- Suresh, M.R., Ramkrishna, S., Adiga, P.R.(1978) Regulation of arginine decarboxylase and putrescine levels in *Cucumis sativus* cotyledons. *Phytochemistry.* 20:1477-88
- 44.- Chowdhuri, M.M., Ghosh, B. (1984) Purification and characterization of diamine oxidase from rice embryo. *Phytochem.* 23:243-43
- 45.- Smith, A.M., Davies, J.P. and Reed, B.J.(1985) Role of Polyamine in Gibberellin-Induced Internode Growth in Peas. *Plant Physiol.* 78:92-99
- 46.- Lin, P.P.C. (1984) Polyamine Metabolism and its Relation to response of the aleurone layers of Barley seed to gibberellic acid. *Plant Physiol.* 74:979-981
- 47.- Flores, M. E. and Galsten, A.W.(1987) Analysis of Polyamines in Higher plants by High Performance liquid Chromatography. *Plant Physiol.* 69:701-706
- 48.- Smith, A.M. and Davies, J.P.(1985) Separation and Quantitation of Polyamines in plant tissues by High Performance liquid Chromatography of their Danoyl Derivatives. *Plant Physiol.* 78:83-91
- 49.- Bewley, I.D., and Black, I.(1978) Physiology and Biochemistry of plant seeds in relation to Germination. Vol 3 Development germination and growth. Springer Verlag. Berlin 304 pp.
- 50.- Fahn, A. (1977) *Plant Anatomy.* segunda edición. Pergamon P. N.Y. 547 pp.

- 51.- Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. (1973) The germination of seed. segunda edición. Vol 5. Pergamon Press. N. Y.
- 52.- Rubenstein, J., Phillips, R.L., Green, Ch. E., and Gengenbach E.G. (1979) The plant seeds: Development, preservation and Germination. Academic Press. N.Y.
- 53.- Berlin (1972) citada por Kozlowsky en "Seed Biology" Vol II (1973) Academic Press. N.Y.
- 54.- Mayer, A.M. and Shain, Y. (1974) Control of seed germination *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:147-93
- 55.- Leiskinger, A.L. (1978) Bioquímica. Las bases Moleculares de la estructura y función celular. 2th. edición. Ed. Omega.
- 56.- Jofre y Sarfian, A.E. (1983) Regulación de la síntesis de amilasa hidrolítica inducida por ácido giberélico en capa de aleurona de trigo Var. Petas 3-70. Tesis de Maestría en Ciencias químicas (Bioquímica) División de Estudios Superiores. Fac. de Química. UNAM.
- 57.- Bernal Lago, I. (1983) Boletín de Educación Bioquímica 1:13-20
- 58.- Jacobsen, J.V. and Chandler, P.W. (1987) Gibberellin and Abscisic Acid in Germinating Cereals. Plant Growth and Development Ed. P.J. Davies. Martinus Nijhoff The Netherland.
- 59.- Bernal-Lago, I. (1975) Efecto post-transcripcional del ácido giberélico en capa de aleurona de trigo. Tesis de Doctorado (Bioquímica) Facultad de Ciencias. UNAM.
- 60.- Jacobsen, J.V. and Higgins, T.J.V. (1982) Characterization of the α -amylase synthesis by aleurone cells of Himalaya barley in response to gibberellic acid. *Plant Physiol.* 70:1647-53

- 61.- Armstrong, Ch., Black, L., Chapman, J.W., Norman, H.I. and Angold, R. (1982). The induction of sensitivity to gibberellin in aleurone tissue of developing wheat grains. *Planta* 154: 173-77
- 62.- Hall, B.A. and Jones, S.L.(1982). α -amylase secretion by single barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 70:1149-1159
- 63.- Collin, J. and Ho, T.W.D.(1983)Multiple molecular forms of the gibberellin-induced α -amylase from the aleurone cells of barley seed. *Arch. Biochem. Biophys.* 224:224-234
- 64.- Garcia-Raga, M(1987) Control Post-transcripcional del ácido abscísico sobre la síntesis de alfa amilasa en aleurona de trigo. Tesis de Maestría (Bioquímica) CINVESTAV-IPN.
- 65.- Finn, R.D.(1975) On the secretion of α -amylase by barley aleurone layers after incubation in gibberic acid. *Planta* 129:227-233
- 66.- Filmer, P.and Varner, J.E.(1967) A test for de novo synthesis of enzymes. Density labelling with $N_2^{15}O$ of barley- α -amylase induced by gibberellic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)* 58:1528-28
- 67.- Bernal-Lago, I., Beachy, R.S. and Varner, J.E.(1981) The response of barley-aleurone layers to gibberellic acid includes the transcription of new sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102(2):617-623
- 68.- Higgins, T.J.V., Fear, J.A., Jacobsen, J.V.(1976) Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for α -amylase in barley aleurone layers. *Nature* 260:166-68
- 69.- Akasaka, Takeshi and Hara-Nishimura, Ikuko(1985). Topographic aspects of biosynthesis extracellular secretion and intracellular storage of proteins in plant cells. *Ann. Rev. Physiol* 47:443-72
- 70.- Jacobsen, J.V. and Iyer, J. A.(1974) Gibberellic acid causes increased synthesis of RNA which contains Poly(A) in barley aleurone tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 71:3290-93

- 71.- Ku-feng Chen and Russell, L. Jones(1974). Studies on the Biology of Barley Aleurone cell proteins: Kinetics of labelling. *Planta (Berl)* 119:193-206
- 72.- Muthakrishnan, S.,Chandra, G.R., and Maxwell, E.S.(1981) Hormonal control of α -amylase Gene expression in barley. *The Journal of biological Chemistry*. 256(4):2370-75
- 73.- Yomo, H. and Varner, J.E.(1971) Current topics in Developmental Biology. 6:111
- 74.- Varty, K.,Laidman, D.L.(1977).*Biochem. Soc. Trans.* 5:326 see also on ref. 48 y ref 45.
- 75.- Jacobsen, J.V. Chandler, P.M., Higgins, T.J.V. and Iwar, J.A. (1982) Control of protein synthesis in barley aleurone layers by gibberellin. *Plant Growth Substances*. Warsaw P.F.(48) Academic Press pp 111-120
- 76.- Jones, R.L. and Jacobsen, J.V.(1982) The role of endoplasmic reticulum in the synthesis and transport of α -amylase in barley aleurone layers. *Planta* 156:421-32
- 77.- Belanger, F.G., Brodl.M.S. and Ho-Tsun'han D.(1986)Heat Shock causes destabilization of specific mRNAs and destruction of endoplasmic reticulum in barley aleurone cells..*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:1354-58
- 78.- Jones, R.L. and Jacobsen, J.V.(1983) Calcium regulation of the secretion of α -amylase isoenzymes and other proteins from barley aleurone layers.*Planta* 158:1-9
- 79.- Jones, R.L.,Carbenell, J.(1984). Regulation of the synthesis of barley aleurone α -amylase by gibberellic acid and calcium ions. *Plant Physiol.* 76:213-18
- 80.- Vigil, E.L., Suidet,L.(1973). Effect of gibberellic acid and actinomycin D on the formation and distribution of rough endoplasmic reticulum in barley aleurone cells. *Plan Physiol.* 51:549-58

- 81.- Stewart, P., Nicol, E., Lott, J.M.A (1988) An investigation of the Mineral Content of Barley Grains and Seedlings. *Plant Physiol.* 56:93-97
- 82.- Jacobson, J.V., Scandalion, J.G. and Varner, J.E.(1979) Multiple forms of amylase induced by Gibberellic acid in isolated Barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 49:167-71
- 83.- Rogers, J.C.(1985) Two Barley α -amylase Gene Families are regulated differently in aleurone cells. *The Journal of Biological Chemistry.* 260 (6):3731-38
- 84.- Chrispeels, P.J. and Varner, J.E.(1971) Gibberellic acid enhances synthesis and release of amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 42:398-406
- 85.- Varner, J.E., Jones, S. E.(1972) Characteristics of the process of enzyme release from secretory plant cells. *Plant Physiol.* 49:187-89
- 86.- Sells, M.(1954) Use of the Danzyl Reaction in Biochemical Analysis. *Methods of Biochemical Analysis.* N.Y. Interscience 14:299-327
- 87.- Tiburcio, Trejo, L.L.(1985) Caracterización Bioquímica de la capa de aleurona de semillas de Bajo Vigor. Tesis. Fac de Quím UNAM.
- 88.- Hamabata, A., García-Gaya, V., Romero, T. and Bernal Lugo, I. (1988) Kinetics of the acidification Capacity of aleurone layer and its effect upon solubilization of reserve substances from starchy Endosperm of wheat. *Communication. Plant Physiol.* 86.