

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE QUIMICA

00562

7
24

ACTIVIDAD DE α -AMILASA EN ALEURONAS DE SEMILLAS DE TRIGO
DETERIORADAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

P R E S E N T A L A
BIOLGUA MIREYA RODRIGUEZ PENAGOS

Bajo la asesoria de la Doctora:

IRMA BERNAL LUGO.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1991



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

Introducción	1
1- Estructura de la semilla de trigo	1
1 (a)- Testa	1
1 (b)- La capa de aleurona	1
1 (c)- El endospermo almidonoso	3
1 (d)- El embrión	4
2- Germinación	5
2 (a)- Vías metabólicas productoras de energía	5
2 (b)- Síntesis de proteínas	6
2 (c)- Síntesis de ARN	6
2 (d) Síntesis de ADN y división celular	6
3- Metabolismo de las células de la capa de aleurona	7
4- Las giberelinas	9
4 (i)- Mecanismo de acción de las giberelinas	9
4 (ii)- Efecto de las giberelinas sobre la capa de aleurona	11
5- Movilización de las reservas del endospermo	11
5 (a)- Movilización de las reservas proteicas	11
5 (b)- Movilización de las reservas lipídicas	11
5 (c)- Movilización de las reservas de carbohidratos	12
6- Vigor y Deterioro	13
7- Determinación del vigor de un lote de semillas	14
8- Factores del deterioro	15
8 (a)- La humedad en el almacén	15
8 (b)- La temperatura en el almacén	16
9- Efectos del deterioro en la semilla	16
9 (a)- Alteraciones Fisiológicas	16
9 (b)- Alteraciones sobre la ultraestructura celular	16
9 (c)- Alteraciones moleculares	16
9 (d)- Alteraciones funcionales	17
10- Estructura de la α -amilasa	18
11- Propiedades enzimáticas de la α -amilasa	19
12- Isoenzimas de α -amilasa	19
13.-Regulación de la síntesis de α -amilasa por ácido giberélico	20
14.- Regulación de la síntesis de α -amilasa por Ca^{++}	23
15.-Procesamiento de las isoenzimas de α -amilasa	24
16.-Actividad de α -amilasa y su relación con el vigor de la semilla	25
Objetivo	27
Materiales y Métodos	29
a)- Procedimiento para el deterioro de las semillas	29
b)- Determinación del porcentaje de germinación acumulado	29
c)- Determinación de la acumulación de peso seco	29
d)- Inducción de la actividad de α -amilasa en aleuronas aisladas	30
e)- Extracción de la actividad de α -amilasa	30
f)- Medición de la actividad de α -amilasa	30
g)- Determinación de la cinética de acidificación	32
h)- Elaboración de zimogramas en geles de electroenfoque	32

i)- Determinación de la capacidad de síntesis de proteínas	33
j)- Electroforésis en geles en placa en condiciones desnaturalizantes	34
k)- Inmunoprecipitación de α -amilasa	35
l)- Determinación de la cantidad de radioactividad recuperada de un pulso de radioactividad	36
m)- Determinación de la Capacidad de Acidificación de aleuronas control y deterioradas en presencia de Glucosa	36
Resultados	38
a)- Determinación de la calidad de la semilla	38
b)- Determinación de la capacidad de la capacidad de acidificación de aleuronas deterioradas y controles	41
c)- Inducción de la actividad de α -amilasa en aleuronas control y deterioradas a diferentes tiempos	43
d)- Determinación de la sensibilidad a ácido giberélico en aleuronas control y deterioradas	45
e)- Isoenzimas de α -amilasa en aleuronas control y deterioradas	49
f)- Determinación de la capacidad de síntesis de proteínas de aleuronas control y deterioradas	51
g)- Cuantificación de la síntesis de α -amilasa	59
Apéndice	62
Discusión	71
Conclusiones	81
Bibliografía	82

ABREVIATURAS

ARN- Acido ribonucleico
ARNt- Acido ribonucleico de transferencia
ARNm- Acido ribonucleico mensajero
ADN- Acido desoxirribonucleico
AG₃- Acido giberélico
ABA- Acido absicico
ISTA- International Seed Testing Association
ATP- Adenosin trifosfato
Asn- Asparagina
His- Histidina
Asp- Acido aspártico
min- minuto
mg- miligramo
°C- centígrados
Ea- Energía de activación
kcal- kilocalorias
p.I.- punto isoeléctrico
cADN- Acido desoxirribonucleico complementario
mM- minimolar
ml- mililitro
rpm- revoluciones por minuto
g- gravedad
p/v- peso/volumen
M- Molar
v/v- volumen/volumen
μl- microlitros
nm- nanómetros
μ- micras
TEMED- N'N'N' Tetrametilen diamina
cm- centímetro
μCi- microcuries
TCA- Acido Tricloroacético
SDS- Sodio Dodecil Sulfato
K_s app- Constante de disociación aparente
K_m- Constante de afinidad
R_{máx}- Respuesta máxima
D- Deteriorado
C- Control
SN- Sobrenadante
Fig.- Figura

INTRODUCCION

El ciclo de vida de una planta comprende varias etapas: la germinación, el crecimiento heterotrófico, la fase vegetativa y la etapa reproductiva.

La vida de una angiosperma se inicia en la semilla, constituyendo ésta un medio por el cual el nuevo individuo se dispersa. La semilla contiene tanto al embrión que dará origen a la nueva planta como a las reservas alimenticias necesarias para su crecimiento en los primeros estadios (3).

La semilla de trigo se halla formada por varias estructuras, a saber, la testa, la capa de aleurona, el endospermo almidonoso y el embrión, mismas que a continuación se describirán brevemente desde el exterior hacia el interior de la semilla.

1) Estructura de la semilla de trigo.

1 (a) Testa.

La testa es la cubierta de la semilla (Fig.A), y constituye una barrera protectora entre el embrión y el medio externo; restringe el intercambio de gases entre el embrión y el medio circundante. Esta cubierta puede estar formada de una ó de varias capas de células y posee cutículas externa e interna, impregnadas con ceras y grasas (3).

1 (b) La capa de aleurona.

La capa de aleurona es la capa de células más externa del endospermo almidonoso (Fig. A) y es morfológica y funcionalmente distinta al resto del mismo. La aleurona en semillas de trigo esta formada de una sola capa de células; son las únicas células del endospermo que permanecen vivas después de que la semilla ha madurado y se ha secado (17).

Las células de la aleurona poseen una pared celular primaria que está compuesta de diversos polisacáridos. Contiene también ácido fenólico unido covalentemente a la pared. Se han encontrado también proteínas, pero no se sabe si forman parte de la

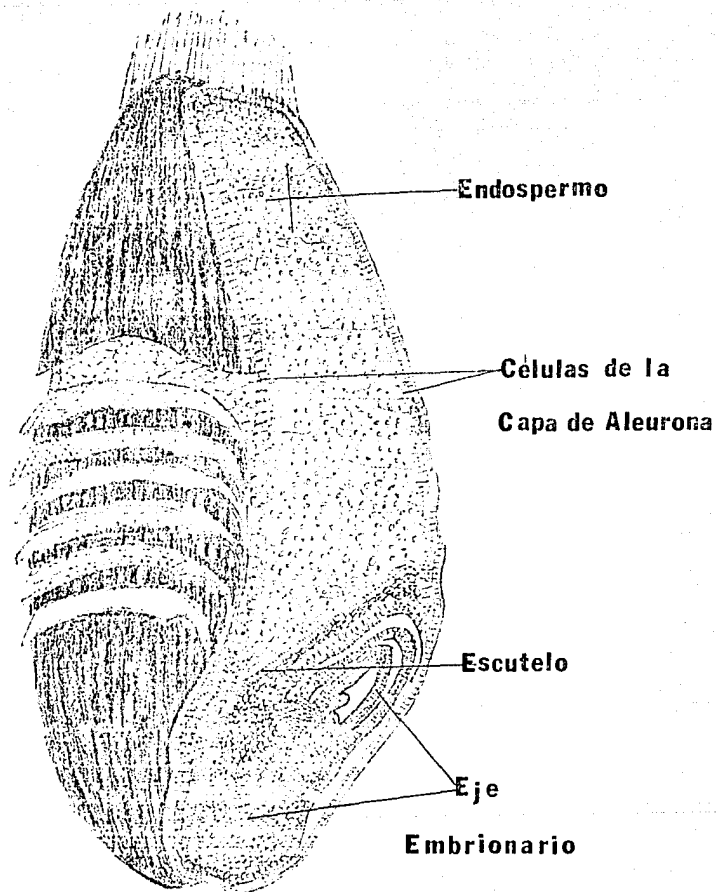


FIG. A. ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE TRIGO. (3)

estructura de la pared (17).

Asimismo, existen canales intercelulares ó plasmodesmos que conectan protoplastos de células adyacentes, mismos que contienen material similar al de la capa interna de la pared celular (17).

En el protoplasto de la aleurona se encuentran cuerpos proteicos ó granos de aleurona que poseen una bicapa lipídica. Estos granos contienen proteínas, presentan inclusiones del tipo I que son globoides, formados de fitina con sales de K^+ , Mg^{++} y Ca^{++} que forman las reservas de minerales de la semilla. También presentan inclusiones del tipo II que contienen α -aminofenol, proteínas y carbohidratos, así como algunas enzimas involucradas en la movilización de reservas (36).

Las células de la aleurona contienen cuerpos lipídicos que rodean a los cuerpos proteicos o se encuentran en la periferia de las células y contienen una matriz de triacilglicéridos almacenados en una membrana de una capa lipídica y algunas proteínas (17).

Los protoplastos de aleurona también poseen reservas de carbohidratos, como sacarosa (la más abundante), rafinosa y fructanos. Igualmente se encuentran reservas de ácidos nucleicos, exo y endopeptidasas y vitaminas (17).

En cuanto a sistemas endocelulares, las células de la capa de aleurona poseen mitocondrias y retículo endoplásmico y en presencia de ácido giberólico (AGB), se induce la formación de glioxisomas, de Aparato de Golgi y de vesículas lisosomales (36).

1 (c) El endospermo almidonoso.

En cuanto al resto del endospermo almidonoso (Fig.A), éste ocupa la mayor parte de la semilla de trigo y es el órgano almacenador de las reservas nutritivas de ésta, constituyendo así el órgano blanco de las enzimas hidrolíticas secretadas por la capa de aleurona y por las secretadas en menor proporción por el escutelo (17,36).

Las células del endospermo están totalmente llenas de gránulos de almidón depositados en órganos subcelulares llamados amiloplastos, los cuales llegan a ocupar la totalidad de la célula. El endospermo posee células muertas con remanentes de núcleo, ribosomas, retículo endoplásmico y ARN. Asimismo poseen también

proteínas de varias clases, y algunas enzimas como: β -amilasa y proteasas además de inhibidores de α -amilasa (17,36).

En estas células también se encuentran cuerpos lipídicos cuyo contenido lo forman triacilglicéridos, así como cuerpos proteicos (36).

1 (d) El embrión.

El embrión está formado por el escutelo y por el eje embrionario (Fig.A). El primero es el órgano que forma el paso entre el endospermo y el eje embrionario y es el encargado de absorber los productos de la hidrólisis de las reservas y transportarlos hacia el eje embrionario en crecimiento (17). Este órgano también participa en la movilización de reservas, ya que secreta en pocas cantidades, y al principio del proceso, algunas enzimas hidrolíticas que actúan sobre las reservas del endospermo.

Las células del epitelio del escutelo poseen cuerpos proteicos rodeados de cuerpos lipídicos, también con inclusiones de fitina. Las células del escutelo presentan pared celular, mitocondrias, ribosomas, núcleo y algo de retículo endoplásmico, además de vitaminas, sacarosa y rafinosa (36).

Por su parte el eje embrionario (Fig.A), consiste en el hipocótilo que da origen a la hoja embrionaria con su cubierta llamada coleóptilo, la radícula con su protección, la coleorriza y por último la plúmula (36).

Las células del eje embrionario son células parenquimatosas y meristemáticas que contienen reservas de carbohidratos, como sacarosa, rafinosa y estaquiosa, además de proteínas, triacilglicéridos y ácidos nucleicos. Poseen protoplastidios, los cuales dan origen a cloroplastos, además contienen núcleo, ribosomas funcionales y mitocondrias (36).

Las células de las estructuras antes descritas activan su metabolismo al hidratarse la semilla misma que al encontrarse en un medio con elevada humedad, inicia la captación de agua, fenómeno conocido como imbibición, mismo que constituye el paso inicial y esencial hacia la germinación.

2) Germinación.

La germinación se puede definir como una cadena de cambios que empiezan con la absorción de agua y conducen a la ruptura de la cubierta seminal por la radícula ó por la plántula (14).

En realidad este fenómeno empieza desde antes de que se realice la ruptura de la cubierta seminal; sin embargo se hace visible mediante este proceso. La protusión de la radícula se realiza mediante la elongación celular en la mayoría de los casos y en otros, ocurre primeramente la división celular y después la elongación. La germinación es producto de un conjunto de procesos fisiológicos y bioquímicos, como la respiración, la actividad enzimática y organelar, la síntesis de proteínas y de ARN procesos que se inician a pocos minutos del comienzo de la imbibición, sin haberse hidratado completamente la semilla y que también preparan al embrión para el crecimiento (36).

2 (a) Vías metabólicas productoras de energía.

La producción de ATP, se lleva a cabo en el embrión y en la capa de aleurona, en la primera hora de imbibición a partir de sustratos de fácil utilización como sacarosa y oligosacáridos de rafinosa (3), y se postula que es la glicólisis la vía oxidativa que se desarrolla en esta etapa, produciéndose etanol (compuesto que después puede ser transformado a Acetil CoA, y ser utilizado en distintas vías metabólicas) (3).

A medida que la imbibición de la semilla progresa, las mitocondrias se diferencian y también se incrementa la concentración de O₂ en la semilla, por lo que entonces se lleva a cabo la respiración aeróbica (17).

Otra vía oxidativa que se realiza en las semillas, es el ciclo de las pentosas, el cual se lleva a cabo en el embrión en crecimiento (17,36).

En cuanto a otras vías metabólicas, en tejidos de reserva se lleva a cabo la β -oxidación, el ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis (17,36).

2 (b) Síntesis de proteínas.

Se ha demostrado que en semillas secas, se encuentran presentes los componentes para llevar efecto la síntesis de proteínas, como son los ARNt, los ARNm, los factores de iniciación, los aminoácidos los ribosomas. Al hidratarse las semillas, se incrementa el número de polisomas (3,17,36).

La síntesis de proteínas se realiza en los primeros minutos de imbibición, y en sus inicios se efectúa a partir de ARN_a preformados y conforme aumenta la imbibición, a partir de ARNm sintetizados *de novo*. La síntesis de proteínas parece ser esencial para la germinación de la semilla, pues si ésta no se lleva a cabo ó se disminuye, afecta a la germinación reduciéndose su velocidad o bien ocasionando la pérdida de la capacidad de germinar de la semilla (6).

2 (c) Síntesis de ARN.

Con respecto a la síntesis de los ARNm en embriones de semillas secas, existen ARN_a denominados preformados, los cuales se sintetizan durante la formación de la semilla. Se dividen en dos clases: los esenciales para la germinación y los que no lo son (36). Al iniciarse la germinación de la semilla, ocurre tanto la degradación de los ARN_a preformados como la síntesis *de novo* de estos polinucleótidos (52).

Si el segundo proceso se ve afectado, ello se refleja directamente en la velocidad con que la semilla germina; disminuye por consiguiente la probabilidad de que la plántula se establezca en el campo (52).

Al entrar los embriones a la fase de crecimiento, la síntesis de ARNm también es primordial, ya que se sintetizan nuevos ARNm necesarios para la síntesis de proteínas características de esta fase (52).

2 (d) Síntesis de ADN y división celular.

En los casos en los que la protusión de la radícula se lleva a cabo por elongación celular, tanto la replicación del ADN como la

división celular son fenómenos post-germinativos (36), mientras que en los que la división celular ocurre antes que la elongación, la síntesis de ADN y la división celular se presentan antes de la germinación de la semilla (36). Recientemente, se ha reportado la síntesis temprana de ADN (17).

Los procesos bioquímicos antes descritos, indispensables para que se lleve a cabo la germinación, se realizan gracias a la hidrólisis de las reservas de disponibilidad inmediata. Los órganos donde se encuentran estas reservas son: el eje embrionario, el escutelo y la capa de aleurona. Tanto las reservas como las enzimas encargadas de hidrolizarlas se encuentran en las células de estos órganos.

Sin embargo, para que se efectúe el crecimiento del eje embrionario, y por consiguiente el crecimiento heterotrófico de la plántula, es necesario un aporte mayor de nutrientes. Estos se obtienen por medio del proceso de movilización de reservas nutritivas de la semilla, que se encuentran almacenadas en el endospermo almidonoso. El proceso de movilización de reservas se inicia después de la germinación de la semilla y consiste en la hidrólisis de macromoléculas de alto peso molecular almacenadas en el endospermo, para a su vez, convertirlas en formas pequeñas fácilmente transportables a tejidos en crecimiento, muy activos metabólicamente (como el eje embrionario), los cuales las utilizan ya sea como fuente de energía ó como precursores en procesos sintéticos (36).

La capa de aleurona es un tejido muy importante en el proceso de movilización de reservas, ya que sintetiza y secreta las enzimas encargadas de la hidrólisis de las reservas del endospermo, además de que también secreta algunos nutrientes para el embrión, como son minerales como Ca^{++} y K^{+} , por lo que la aleurona realiza la hidrólisis de sus propias reservas, necesaria para desempeñar las funciones antes mencionadas durante las etapas finales de la germinación.

3) Metabolismo de las células de la capa de aleurona.

Durante la germinación se inicia el cambio del metabolismo de la aleurona de un estado quiescente a uno totalmente activo, este

último ya se presenta durante el proceso de movilización de reservas de la semilla (36).

Durante la hidrólisis de las reservas de las células de la capa de aleurona, se degradan inicialmente los triacilglicéridos de los cuerpos lipídicos por la acción de una lipasa neutra. Dichos compuestos constituyen una fuente importante de energía metabólica ó bien pueden ser los precursores para la síntesis de componentes membranales (36).

La lipasa se encuentra ya sintetizada y unida a los cuerpos proteicos. Al hidratarse la semilla se inicia la movilización de esta lipasa, de los cuerpos proteicos hacia los cuerpos lipídicos, proceso que parece estar regulado por el ácido giberélico (AG₃) (16). Al mismo tiempo, la hidrólisis de los triacilglicéridos parece estar también regulada por el endospermo almidonoso.

Junto con la actividad de la lipasa se presenta la de las enzimas de la β -oxidación y la de las del ciclo del glioxílico. La actividad de estas últimas enzimas, según reporta Doig y colaboradores, es inducible por el ácido giberélico (15).

En cuanto a la hidrólisis de las proteínas almacenadas en la aleurona, éstas son hidrolizadas por una proteasa preformada inicialmente. Posteriormente el AG₃ induce la síntesis *de novo* de otras proteasas, incrementándose la concentración de aminoácidos libres. Parte de los aminoácidos producidos por la acción de las proteasas son secretados hacia el endospermo almidonoso; tal secreción parece estar regulada por el giberélico (36).

En lo que hace al metabolismo de los carbohidratos en las células de la capa de aleurona, al aplicarse ácido giberélico se libera glucosa y fructosa. Se ha observado que una parte de estos azúcares permanece dentro de las células y otra se secreta (la secreción posiblemente esté regulada también por el AG₃) (36).

Por lo que respecta a las reservas minerales, se ha encontrado que en las primeras 5 horas de la germinación se moviliza casi todo el K⁺, Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺ de las células de la aleurona. Estos iones también se liberan hacia el endospermo almidonoso, y la solubilización de los mismos parece ser independiente de AG₃, mientras que la solubilización de la fitina probablemente es dependiente de una disminución de pH (36).

En relación con lo anterior, como es posible prever el proceso de

movilización de reservas en semillas de trigo y en cereales tiene la característica de ser fuertemente regulado por las giberelinas (30), fitohormonas que son sintetizadas en el embrión de la semilla al hidratarse esta estructura.

4) Las giberelinas.

Las giberelinas son fitohormonas que químicamente pertenecen a la clase de los diterpenos. Presentan cierta relación estructural con las hormonas esteroideas de animales y a la fecha se han identificado 38 diferentes giberelinas (40).

Al hidratarse el embrión, en semillas de trigo se inicia la secreción del ácido giberélico, ya sea preformado ó sintetizado *de novo*, ácido que es transportado hacia los órganos blanco como el escutelo y la capa de aleurona (30).

La mayoría de las giberelinas poseen el esqueleto carbonado del ent-giberelano con 20 carbonos, las otras han perdido un átomo de carbono y presentan 19 carbonos (30) (Fig. B).

4 (i) Mecanismo de acción de las giberelinas.

Se ha estudiado la relación estructura química-actividad biológica de las giberelinas y la posible existencia de un receptor para estas fitohormonas. Con respecto al primer punto, diversos autores (31,32,33,58,22) postulan que las giberelinas con actividad biológica son aquellas con esqueleto C_{19} y con el anillo de lactona γ - $C-19$, con un grupo hidróxilo en β en el C_3 y con ó sin grupos metilo en el C_2 , como es el caso del AGS.

La hidroxilación de los C_2 y C_3 , disminuye la actividad biológica de las giberelinas. La presencia de un grupo carboxilo libre en el C_6 , parece ser necesaria para la actividad biológica; probablemente porque forma parte del reconocimiento de la hormona por el receptor (55).

En relación al segundo punto, sobre la posible existencia de un receptor para giberelinas, se ha postulado tanto un receptor citoplásmico (63) como uno membranar (23).

En cuanto al citosólico, se ha identificado un receptor de naturaleza proteica en homogenados de hipocótilo de pepino y de

chícharo, que une reversiblemente ^3H -GA₄ a un pH óptimo de 7.5, es saturable, de alta afinidad, específico para giberelinas con actividad biológica y no une otras fitohormonas como el ABA (63). Por su parte, Hooley y colaboradores (23), reportan la posible existencia de un receptor membranar en aleuronas de avena, este receptor es capaz de unir covalentemente a derivados de giberelinas con actividad biológica y al parecer se encuentra en la superficie externa de la membrana, puesto que entre otras cosas une suero anti-idiotipos del anticuerpo monoclonal de AG₄.

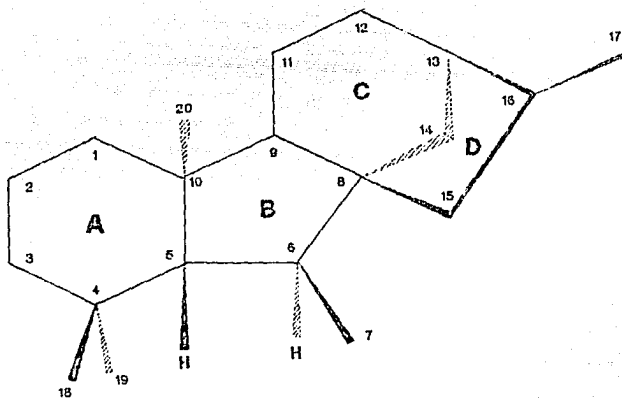


Figura B. Estructura del ent-gibberelano (33).

Algunos autores han propuesto un mecanismo similar al de las hormonas esteroides en animales para las giberelinas dada la similitud química entre ellas, pero aún no se ha podido comprobar que éste se lleve a cabo en las giberelinas (23).

4 (ii) Efecto de las giberelinas sobre la capa de aleurona.

En la movilización de reservas en semillas de cereales, el ácido giberélico regula, en la aleurona y en menor grado en el escutelo, la síntesis y/o la secreción de enzimas hidrolíticas, la síntesis de proteínas y de ARN, la proliferación del retículo endoplásmico, la formación de glioxisomas y de vesículas lisosomales y el incremento de la permeabilidad de las membranas de las células de los órganos blanco (3,40).

5) Movilización de las reservas del endospermo.

5 (a) Movilización de las reservas proteicas.

Las reservas proteicas del endospermo se encuentran dentro de los cuerpos proteicos. Las proteínas son hidrolizadas por la acción combinada de proteasas y carboxipeptidasas, sintetizadas *de novo* en la capa de aleurona. Los productos de la acción de estas enzimas son péptidos pequeños y aminoácidos libres, los cuales son absorbidos por el escutelo que finaliza la hidrólisis de los péptidos a aminoácidos libres, transportándolos posteriormente al eje embrionario (3).

De la misma manera, la fitina de los cuerpos proteicos previa solubilización, es hidrolizada por la fitasa y los iones son solubilizados (34,30).

5 (b) Movilización de las reservas lipídicas.

La hidrólisis de los triacilglicéridos de los cuerpos lipídicos, se inicia poco después de la imbibición. Las lipasas que realizan este proceso, ó son preformadas y se encuentran en el endospermo ó bien se sintetizan *de novo* en la aleurona. Estas enzimas hidrolizan el enlace ester de los triacilglicéridos, dando como

resultado glicerol y ácidos grasos libres (3).

El glicerol puede ser incorporado a la glicólisis y los ácidos grasos a su vez son oxidados en la β -oxidación, hasta Acetil-CoA (compuesto que puede ser utilizado en la vía de los ácidos tricarbónicos o bien, ser el sustrato en el ciclo del glioxílico para la síntesis de hexosas en el eje embrionario) (3).

5 (c) Movilización de las reservas de carbohidratos.

El almidón es la reserva de carbohidratos más abundante en semillas de trigo, esta compuesto por cadenas lineares de glucosa (amilosa) con enlaces glucosídicos α (1- \rightarrow 4) y por cadenas ramificadas de glucosa (amilopectina) con enlaces α (1- \rightarrow 4) y α (1- \rightarrow 6).

Estas cadenas son hidrolizadas por un conjunto de enzimas, hasta glucosa y unidades de maltosa, las cuales son:

i) α -amilasa. Es una endoamilasa que hidroliza enlaces glucosídicos α (1- \rightarrow 4), tanto de las cadenas de amilosa como de amilopectina, dando como resultado glucosa y maltosa libres, en el primer caso y en el segundo, además dextrinas límite.

ii) β -amilasa. Es una exoamilasa hidroliza también enlaces glucosídicos α (1- \rightarrow 4) y de su acción sobre la amilosa, resultan unidades de maltosa libres, y en el caso de la amilopectina resultan además dextrinas límites.

iii) Enzima desramificadora y dextrinasas límite. Hidrolizan enlaces glucosídicos α (1- \rightarrow 6) de la amilopectina.

iiii) α -glucosidasa. Esta enzima hidroliza unidades de maltosa para dar como producto glucosa libre.

Tanto la glucosa como la maltosa libres son absorbidas por el escutelo, el cual finaliza la hidrólisis de las unidades de maltosa y sintetiza sacarosa, misma que es transportada hacia el eje embrionario (3,31,38).

El funcionamiento eficiente de las enzimas encargadas de la movilización de reservas de la semillas, depende de el embrión y del resto de la semilla; mientras que la viabilidad de la semilla y la asimilación de los nutrientes producto de la movilización de las reservas, depende del embrión. El desempeño adecuado y coordinado de estas estructuras, auguran un establecimiento óptimo

de la plántula aún en condiciones ambientales adversas. Lo anterior es reflejo de una realización adecuada tanto de las funciones fisiológicas como bioquímicas de las estructuras de la semilla, además de otros factores como es la carga genética de la misma, todo lo cual conforman el vigor de la semilla.

6) Vigor y Deterioro.

El vigor definido por la ISTA (41), es la suma total de aquellas propiedades de la semilla que determinan el nivel de actividad y comportamiento de la semilla o de un lote de semillas durante su germinación y emergencia de la plántula. Las semillas que se comportan bien se llaman semillas de alto vigor y semillas que se comportan pobremente son denominadas de bajo vigor.

De una manera práctica, el vigor es una medida de la habilidad de la semilla para emerger y crecer rápidamente y bien después de la germinación en condiciones no óptimas (52).

Al vigor de la semilla lo modifican diversos factores (41) como son:

- a) El genotipo de las semillas.
- b) El medio ambiente y la nutrición de la planta madre.
- c) Condiciones de maduración y estado de maduración de la semilla al momento de la cosecha.
- d) Tamaño, peso y peso volumétrico de la semilla.
- e) Deterioro y Envejecimiento.
- f) Agentes patógenos.

Con respecto al deterioro, éste causa una disminución en el vigor de las semillas inicialmente, hasta llegar a eliminar la capacidad de germinación de las mismas. El deterioro es resultado de una compleja interacción del tiempo, la temperatura, y de otros factores ambientales que causan alteraciones en las semillas y finalmente la muerte (46).

El envejecimiento de la semilla es equiparable al deterioro, sin embargo, ambos fenómenos son distintos a la senescencia, pues mientras los primeros son eventos no programados dentro de la semilla y sin consecuencias benéficas para ella; el segundo fenómeno, la senescencia, es producto de un desarrollo natural de la planta que tiende a ocurrir en momentos definidos del ciclo de

vida de estos organismos y parece tener un valor fisiológico favorable para la planta (46,44).

7) Determinación del vigor de un lote de semillas.

Para cuantificar el vigor de un lote de semillas y por ende, la calidad del mismo, así como la disminución en este parámetro, se han reportado varias pruebas que abarcan tanto la germinabilidad de la semilla como el crecimiento heterotrófico de la nueva plántula. Entre estas pruebas se encuentran:

a) La germinabilidad de un lote de semillas, determinado a través del porcentaje de germinación presentado por el lote a un tiempo determinado, siendo la pérdida de la viabilidad la prueba más obvia de que la semilla ha perdido calidad (41,46). Al mismo tiempo, la baja germinabilidad de un lote demostrada en condiciones de laboratorio, evidentemente dará como resultado un bajo porcentaje de emergencia de las semillas en el campo (46).

b) La velocidad de germinación de un lote de semillas; esta prueba es más sensible a la disminución del vigor que la pérdida de viabilidad, ya que la velocidad de protusión de la radícula se disminuye antes de que ésta pierda la capacidad para elongarse (46). Dentro de esta determinación también se toma en cuenta la sincronía del lote al germinar, ya que una variación en este último aspecto pueda ser indicio de un comienzo de deterioro.

Existen otras pruebas que se aplican después de que la semilla ha germinado como son: i) la velocidad de acumulación de peso seco (velocidad de crecimiento) en la radícula y el coleóptilo de la plántula ii) las anomalías presentadas en estas estructuras y iii) la prueba de envejecimiento acelerado, en la cual se almacenan las semillas a humedad saturante y a 40°C, por 72 horas, al término de este tiempo se aplican las pruebas antes mencionadas y el lote que obtenga mejores resultados es el más vigoroso (41,46).

Además de lo anterior, se han propuesto diversas actividades enzimáticas como indicadoras de la viabilidad y del vigor de las semillas como son : la de la fenolasa, la peroxidasa, la catalasa, que se ha observado que disminuyen en relación con el incremento del deterioro, sin embargo hasta ahora no han sido indicadores

precisos de la disminución del vigor de las semillas (46).

B) Factores del deterioro.

La disminución del vigor de las semillas, es causado tanto por factores físicos como biológicos que se encuentran en el almacén ó en el campo (41,46).

Entre los factores físicos tenemos a la humedad, la temperatura, la atmósfera de almacenamiento de la semilla, el daño mecánico sufrido durante la cosecha. Entre los biológicos tenemos, la invasión por hongos, insectos y roedores (41,46).

Entre los primeros, los más importantes son la temperatura y la humedad, un manejo eficiente de estos dos factores minimiza los cambios sufridos por la semilla durante el almacenamiento (46).

B (a) La humedad en el almacén.

Las condiciones de almacenamiento óptimas, son a una humedad relativa del 20% y a una temperatura entre 0 y 4 °C, a este respecto existen condiciones particulares óptimas de almacenamiento para cada especie (46).

Un aumento en la humedad relativa en el almacén, ocasiona un incremento en el contenido de agua de la semilla, que idealmente al ser almacenada debe de ser del 5 al 13%, este incremento de agua desencadena varios procesos en la semilla como son: i) Un aumento en la respiración.- Al aumentar la humedad del almacén, la respiración de la semilla se incrementa, ocasionando una elevación en la temperatura y en la concentración de CO₂ en el almacén, creándose una atmósfera de anerobiosis que causa el deterioro de las semillas. Ya que la respiración se realiza gracias a las reservas de disponibilidad inmediata de las mismas, éstas disminuyen, ocasionando esto probablemente una menor velocidad de germinación de las semillas (3,41). ii) Daños funcionales.- Al incrementarse la cantidad de agua libre en la semilla, se disparan algunas funciones bioquímicas características de la germinación, que al no poderse llevar a término por no encontrarse la semilla en condiciones adecuadas sufren daños disminuyéndose así el vigor de la semilla (46).

8 (b) La temperatura en el almacén.

Con respecto a la temperatura, un incremento tanto en la temperatura como en la humedad del almacén, además de causar un incremento en la respiración de la semilla, favorece la invasión tanto de hongos como de insectos que causan daños en la semilla (3,41,46).

9) Efectos del deterioro en la semilla.

9 (a) Alteraciones Fisiológicas.

Entre los efectos reportados del deterioro sobre la fisiología de la semilla están, una disminución en la velocidad de germinación y de crecimiento de la misma (3,46), la pérdida de la capacidad de formación de raíces en embriones de trigo envejecidos (18), además de anomalías en las plántulas (41).

9 (b) Alteraciones sobre la ultraestructura celular.

En células de embriones envejecidos, se ha observado que estos presentan una coalescencia en los cuerpos lipídicos, las membranas parecen sufrir un retraimiento, los núcleos presentan forma lobulada, las mitocondrias y plastidios presentan perfiles distorsionados y se disminuye la formación de polisomas (3,46).

Aunado a lo anterior, las células de semillas deterioradas son incapaces de responder osmóticamente manifestándose ello en una salida de metabolitos de las células y de las semillas, salida que ha sido utilizada como una prueba de vigor (46).

9 (c) Alteraciones moleculares.

Se han reportado tanto daños en lípidos como en proteínas (46). Con respecto a los primeros, se ha observado que semillas con alto contenido de lípidos como reserva se deterioran rápidamente, esto parece ser producto de la degradación de estas moléculas debido posiblemente a reacciones de peroxidación que ocurren en el

almacén, o a la acción de lipasas ya sea de la semilla o de la microflora circundante (46).

En lo que se refiere a las proteínas, estas cumplen dos funciones en la semilla, sirven como compuestos de reserva o bien como enzimas, por ello se registran efectos del deterioro sobre ambas funciones. Con respecto a la primera, se observa un cambio en las propiedades de solubilidad de las proteínas conforme se incrementa el tiempo de almacenamiento de la semilla, lo cual indica que existen alteraciones en la estructura de estas moléculas, como serían fenómenos de proteólisis ó polimerización de las mismas (3,46).

Con respecto a la función enzimática, se reportan varios casos de reducción de ciertas actividades enzimáticas conforme la semilla se deteriora como son: la de la β -amilasa, α -amilasa, catalasa, entre otras (3,46). Esta disminución en la actividad de estas enzimas no se sabe si se debe a un efecto sobre la actividad misma de la enzima, o bien a una menor síntesis de la proteína. A este respecto, se observa también un retraso en el cambio del perfil de isoenzimas durante la germinación en semillas deterioradas, o bien, éste cambio no se lleva a cabo, como es el caso de la peroxidasa en arroz. (46).

En cuanto a los carbohidratos parece ser que ocurre un consumo de las reservas de primera utilización, como sería el caso de la rafinosa (3), probablemente por la respiración que se lleva a cabo durante el almacenamiento.

9 (d) Alteraciones funcionales.

Entre las alteraciones funcionales causadas por el deterioro, se ha reportado que disminuye la cantidad de ATP en las células de semillas deterioradas, esto puede ser consecuencia de una mala formación estructural de las mitocondrias al iniciarse la germinación, por lo tanto son incapaces de sintetizar ATP (3,46). Aunado a lo anterior, la capacidad de síntesis de proteínas en embriones de semillas deterioradas es menor en comparación con la presentada por embriones de alto vigor. Lo anterior, en parte se puede deber a una degradación de ARNm preformados o a una disminución en la síntesis de los mismos, o bien a un daño en las

Componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas, como un menor número de polisomas que se ha observado se presenta en semillas de bajo vigor (3,46).

Asimismo, en grados extremos de deterioro, se reportan también daños en el ADN, aberraciones cromosómicas, y un retardo en la división celular (3,46).

A la luz de las alteraciones mencionadas producidas por el deterioro, y ya que en la semilla de trigo el almidón es el principal compuesto de reserva, una disminución en la actividad de las enzimas involucradas en su hidrólisis como por ejemplo la α -amilasa, se reflejaría ampliamente en el proceso de movilización de reservas y por lo tanto en el crecimiento heterotrófico de la plántula. Esta enzima, como ya ha sido mencionado, participa en la hidrólisis del almidón después de que la germinación ya se ha llevado a cabo. La actividad de α -amilasa en semillas deterioradas de trigo puede ser un indicio del funcionamiento de la aleurona en ellas y por ende, del funcionamiento general de la semilla durante la movilización de reservas.

Por ello, el estudio de esta enzima en relación al vigor de las semillas se vislumbra como importante, siendo este uno de los objetivos del presente trabajo, por lo que se expondrán varias de las características estructurales y enzimáticas de la α -amilasa, además de la regulación de su síntesis y secreción en la capa de aleurona y su relación con el vigor de la semilla.

10) Estructura de la α -amilasa.

Se ha reportado la estructura tridimensional de la α -amilasa pancreática de puerco (7), que es similar a la de otras fuentes. Consta de una sola cadena polipéptica con 496 residuos, posee 5 puentes disulfuro y dos grupos tiol libres; la enzima requiere de un ión Ca^{++} esencial para su integridad estructural. En α -amilasa del Grupo 2 de cebada, se reportan (58) 403 residuos de aminoácidos, y para el Grupo 1, 414.

Por su parte, en trigo se reporta que la α -amilasa no posee grupos sulfhidrilo (60). Se identifican tres dominios en la α -amilasa pancreática (7), conocidos como A, B y C. El dominio B se une al A por un puente disulfuro y por el ión Ca^{++} , el C está unido al A

por la cadena polipeptídica. En el dominio C se encuentra la secuencia donde se unen los carbohidratos al ser glicosilada la proteína, aunque en trigo y cebada se reporta que la α -amilasa no está glicosilada (25).

El sitio activo de la enzima se encuentra en una hendidura situada entre el dominio A y el B, el sitio de unión a el ión Ca^{++} está formado por un Asn y una His del dominio A y por dos Asp del dominio B. El ión Ca^{++} parece estabilizar el sitio activo de la enzima por la inducción de un puente iónico entre los dominios A y B. Existen seis regiones bien conservadas entre las α -amilasas de distintas fuentes (57), regiones que comprenden residuos de aminoácidos que participan en la unión del sustrato y la catálisis, así como en la unión a el ión Ca^{++} .

11) Propiedades enzimáticas de la α -amilasa.

Tkachuk y colaboradores en un estudio (60) efectuado con α -amilasa de trigo duro rojo de primavera, reportan un peso molecular de 45000 daltones determinado por coeficiente de sedimentación y de 42500 daltones por electroforesis desnaturalizante; el punto isoeléctrico de esta enzima es de 6.1 a 6.2.

La actividad enzimática presenta un pH óptimo de 5.5 a 5.6, y una actividad específica de 1465 μmoles de maltosa por min por mg de proteína a 25 °C.

La enzima es estable a 50 °C, y por tiempos cortos también lo es a 60 y 70 °C, presenta una relación lineal en una gráfica de Arrhenius de 20 a 60 °C, con una E_a de 8.71 kcal mol⁻¹deg⁻¹.

12) Isoenzimas de α -amilasa.

Se han reportado varias isoenzimas tanto para α -amilasa de trigo como para cebada, que presentan un peso molecular muy semejante y se clasifican según su punto isoeléctrico. Las isoenzimas reportadas en trigo son más numerosas que en cebada, y en las dos especies se han dividido en dos grupos.

En trigo se tiene el Grupo I o de Alto p.I. producido por el loci (α -Azy 1) en el grupo de cromosomas 6, los p.I. de estas enzimas van de 6.3 a 7.5. El Grupo II o de Bajo p.I., codificadas por el

loci (α -Amy 2) en el grupo de cromosomas 7 cuyos puntos isoelectrónicos que van de 4.9 a 6.0 (37). Las isoenzimas de un mismo grupo presentan patrones proteolíticos muy semejantes, pero entre los grupos estos son diferentes (26). Al mismo tiempo sus cADN presentan un 78% de homología entre grupos.

Asimismo, difieren en la temporalidad de aparición después de la germinación y en su regulación. Las isoenzimas del Grupo I, son las más abundantes, aparecen más tempranamente en comparación con las del Grupo II y son las que más contribuyen a la actividad total de α -amilasa (24).

Las isoenzimas del Grupo II aparecen después de las del Grupo I, y contribuyen en menor proporción a la actividad de α -amilasa (24).

En cebada al igual que en trigo se presentan dos grupos también. Las del Grupo II o de Alto p.I. que van de 5.9 a 6.6, codificadas por el loci (α -Amy 1) en el cromosoma 6 y el Grupo I o de Bajo p.I., producidas por el loci (α -Amy 1) en el cromosoma 1, y sus p.I. van de 4.6 a 5.2 (42,49).

En cebada las del Grupo I o de Bajo p.I., aparecen más tempranamente y son activas hasta después de 40 horas de haberse aplicado AGs en aleuronas, las del Grupo II o de Alto p.I. aparecen después de 12 horas de incubación con AGs y a mayores concentraciones de esta fitohormona, su actividad declina después de las 32 horas de incubación con AGs (26,42),

El significado fisiológico de que existan dos grupos de isoenzimas parece estribar en el hecho de que las isoenzimas que aparecen tempranamente son más activas sobre gránulos de almidón insolubles, mientras que las que aparecen después, lo son sobre gránulos solubles (17).

13) Regulación de la síntesis de α -amilasa por Acido Giberélico.

Se ha reportado que el ácido giberélico regula tanto la transcripción de algunos genes en la aleurona como la traducción de algunos ARNm. Al agregarse ácido giberélico a aleuronas aisladas se observa una disminución en la síntesis de ARNm total y de ARNr en comparación con la encontrada en ausencia de AGs (27), acompañada de un incremento en el nivel de ARNm de α -amilasa (2). Este último se presenta a las 8 horas de incubación con AGs y

coincide con la cinética de aparición de la actividad de α -amilasa (2).

Zwar y colaboradores reportan que este aumento observado en el nivel de ARNm de α -amilasa se debe en parte a una mayor velocidad de transcripción de los genes de esta enzima, y probablemente también a que el AG₃ provoque una mayor estabilidad de los ARNm de α -amilasa sintetizados (64). A nivel de traducción, se ha visto que en presencia de AG₃, se disminuye notablemente la síntesis de otras proteínas diferentes de α -amilasa, y se aumenta la de esta proteína misma que constituye el 60% de la proteína sintetizada (49).

Con respecto a este último aspecto, el aumento de la proteína sintetizada no corresponde a la cantidad de ARNm de α -amilasa sintetizada, por lo que se piensa que el AG₃ ejerce un efecto adicional sobre la traducción de ARNm de esta enzima (49).

La síntesis de los mensajeros de las isoenzimas de α -amilasa se regulan, al parecer, distintamente. En trigo se ha reportado que la acumulación de ARNm de los dos grupos de isoenzimas se inicia a partir de las 12 horas de incubación de aleuronas con AG₃ siendo máxima a las 24 horas. El ARNm del grupo A₃ y 1 (Alto p.I.) disminuye a las 48 horas de incubación, mientras que el del A₃ y 2 (bajo p.I.) se sigue incrementando hasta las 96 horas de incubación con AG₃ (37).

En cebada se observa algo semejante. El ARNm de las isoenzimas de Bajo p.I., se encuentra presente en pequeñas cantidades sin adicionar AG₃; al adicionar esta fitohormona se incrementa su concentración hasta las 48 horas. En relación con las de Alto p.I., el ARNm de estas isoenzimas aparece a las 8 horas de incubación con AG₃ a mayores concentraciones que con las que aparece el ARNm para el Grupo I, desapareciendo el ARNm de las isoenzimas del Grupo II a las 24 horas de incubación (43).

Al mismo tiempo, se han encontrado regiones importantes para el control de la expresión de los genes tanto del loci A₃ y 2 como del A₃ y 1. En el primer caso éste se encuentra a 300 pares de bases a la izquierda del inicio de la transcripción, y en el segundo, a 600 pares de bases (24). A este respecto, Du Lee y colaboradores (45) reportan que una proteína inducible por AG₃ se une en un segmento del gen A₃ y 2 a -143 pares de bases en aleuronas de

arroz, lo cual postula a estas regiones como reguladoras en la expresión de los genes de α -amilasa.

14) Regulación de la síntesis de α -amilasa por Ca^{++} .

La posible regulación de la síntesis de α -amilasa por Ca^{++} , se propuso a raíz de que se observó que cuando se agregaba Ca^{++} al medio de incubación con AG_3 , se incrementaba la producción de la actividad de α -amilasa en aleuronas de cebada (10).

Se propuso que el Ca^{++} actuaba a nivel de transcripción y de traducción. Sin embargo, a la fecha se sabe que es a nivel traduccional. A este respecto Jones y colaboradores (29) reportan que el calcio no se requiere para la síntesis de ARNm tanto de las isoenzimas de Alto p.I. como las de Bajo p.I. de cebada. El control de la síntesis de este nucleótido parece ejercerlo únicamente el AG_3 .

En cuanto a la síntesis del péptido de α -amilasa, en presencia de AG_3 y de Ca^{++} , se observa en cebada la máxima producción del mismo (8), en comparación a cuando sólo esta presente el AG_3 .

Ya que la α -amilasa es una metaloenzima que contiene Calcio, se ha estudiado la estabilidad de la enzima sintetizada en presencia de este ión, sobre esto, Bush y colaboradores (8) reportan que el Ca^{++} no incrementa significativamente la estabilidad tanto de la actividad enzimática secretada como la de la proteína en sí, de los dos grupos de isoenzimas de cebada.

El papel importante del calcio en relación con la α -amilasa parece estar en la secreción de las isoenzimas de Alto p.I.. En ausencia de calcio no se observa la acumulación en el medio de las isoenzimas de Alto p.I., principalmente. Asimismo, se ha observado que para la secreción de estas isoenzimas es necesaria la presencia continua de Calcio y que ésta también es dependiente de la concentración del ión en aleuronas y en protoplastos aislados de estas células (8).

Lo anterior indica que la actuación del calcio en la secreción de las isoenzimas de Alto p.I. es tanto a nivel de pared celular como ha sido propuesto por algunos autores, como a nivel de membrana celular (8).

Aunado a lo anterior, y puesto que el calcio del citoplasma es utilizado

tanto para la síntesis de α -amilasa como posiblemente para su secreción, Bush y colaboradores (9), han indicado que la cantidad medida de calcio en el citosol no es suficiente para la demanda que implica la síntesis de α -amilasa. Ellos demuestran que en el retículo endoplásmico existe una concentración mayor en un orden de magnitud en comparación con la del citoplasma. El calcio es acumulado en esta estructura por una bomba de calcio dependiente de ATP, siendo esta acumulación estimulada importantemente por AG α .

Ya que el retículo endoplásmico es un órgano involucrado en procesamiento de la α -amilasa, los autores proponen que la regulación del flujo de calcio del citoplasma hacia el retículo endoplásmico por el AG α es una manera de regular también la síntesis de α -amilasa por el AG α .

En cuanto al procesamiento y secreción de la α -amilasa, se ha observado que los péptidos no procesados de α -amilasa poseen una secuencia señal (51), lo cual implica un procesamiento de los mismos en el retículo endoplásmico. Lo anterior se corrobora con el hecho de que se han encontrado péptidos recién sintetizados de esta enzima en el lumen del retículo endoplásmico, por lo que se postula que el retículo endoplásmico participa en la vía de secreción de la α -amilasa (39), junto con el Aparato de Golgi, que se ha observado, por métodos inmunocitoquímicos, que transporta α -amilasa (19).

15) Procesamiento de las isoenzimas de α -amilasa.

Se ha propuesto que la diversidad de las isoenzimas que existen de α -amilasa, puede originarse por un procesamiento diferente de los ARNm sintetizados o bien por un procesamiento post-traducciona1 de los péptidos sintetizados (49).

Con respecto a la segunda posibilidad, Jacobsen y colaboradores (25), reportan que algunas isoenzimas de Bajo p.I. en aleuronas de cebada, se originan por una modificación covalente de los péptidos de las isoenzimas al ser secretados Tal modificación disminuye el punto isoeléctrico de las proteínas secretadas al medio, por lo cual los precursores pueden ser observados dentro de las células de la aleurona con un punto isoeléctrico mayor al de los péptidos

que dan origen (25). Esta modificación no parece ser una glicosilación ya que las isoenzimas de cebada y de trigo no se ha visto que sean glicosiladas (59,25).

16) Actividad de α -amilasa y su relación con el vigor de la semilla.

Se ha relacionado la disminución de la actividad de la enzima α -amilasa con la disminución del vigor de las semillas de trigo. A este respecto, Aspinall y colaboradores en 1977 (1) reportan que, en aleuronas de semillas de trigo almacenadas por lapsos, la actividad de α -amilasa secretada disminuye al igual que la capacidad de responder al ácido giberélico. Dicha disminución se correlaciona con el decremento en la velocidad de germinación observada en la semilla.

Asimismo, también se ha relacionado la heterosis (vigor híbrido) con la concentración endógena de giberelinas (50). Por lo tanto, los procesos regulados por ellas, como la velocidad de germinación, el crecimiento subsecuente de la plántula y la síntesis de α -amilasa, pueden ser una manifestación de la heterosis en plántulas de maíz.

En este estudio (50), se demostró que los híbridos tenían una mayor velocidad de germinación que los padres. Lo mismo se presentaba con el contenido de GA₁ y exhibían una mayor actividad de α -amilasa, extraída de semillas y de plántulas. Por ende, la heterosis se manifiesta en los niveles de α -amilasa de las semillas, lo cual les conferiría a las plántulas híbridas una ventaja inicial al germinar y crecer más rápidamente en comparación con plántulas no híbridas.

También se ha estudiado la actividad de α -amilasa, en relación con la carencia o estrés de agua en hojas de cebada (28). En este estudio, realizado en plántulas de este cereal sometidas a un estrés de agua, se observa que en las hojas se incrementa la actividad de α -amilasa en comparación con la presentada por hojas no estresadas. Se comprobó que el incremento de actividad de esta enzima se debe a un aumento en la concentración del ARNm de α -amilasa.

La explicación fisiológica de este fenómeno podría ser que la

planta tiene necesidad de transportar nutrientes como monómeros de azúcar a otras partes de la misma con mayores probabilidades de sobrevivir (28).

Por el contrario, en aleuronas de cebada sometidas a un choque de alta temperatura, se observa una disminución en la actividad de α -amilasa producida por ellas (57). Esta disminución que se comprobó que se debía a una reducción en la síntesis de proteínas de la aleurona, y por consiguiente, en la síntesis del péptido de α -amilasa. Asimismo, la menor síntesis de proteínas que se determinó, no se debía a un daño en el retículo endoplásmico sino posiblemente a que éste órgano se reorganiza de manera tal que ya no es capaz de llevar a cabo la síntesis ó el transporte de proteínas secretorias.

Por otra parte, en nuestro laboratorio (59) se determinó que semillas de trigo con bajo vigor presentan una menor actividad de α -amilasa comparada con la exhibida por aleuronas control. A los 5 días de haberse sembrado, período en el cual se presenta la máxima actividad de α -amilasa, se observó una actividad para plántulas control de 0.87 unidades de α -amilasa por individuo contra 0.58 unidades de α -amilasa por individuo en plántulas deterioradas.

OBJETIVO.

En vista de que tanto el crecimiento heterotrófico de la semilla como su velocidad dependen de la disponibilidad de nutrientes producidos por la hidrólisis de las reservas de la semilla, y de que este último fenómeno se produce gracias a la acción de enzimas hidrolíticas sintetizadas y secretadas por la capa de aleurona, una alteración en esta función se manifestaría en una disminución de la velocidad de crecimiento de la plántula y del crecimiento en sí de la misma. Por lo tanto, disminuiría el vigor de la semilla. La síntesis y secreción de la enzima α -amilasa en la capa de aleurona de cereales es un fenómeno estrictamente regulado. La acción biológica de esta enzima parece ser fundamental para el crecimiento heterotrófico de la plántula y para su sobrevivencia. Es posible determinar, con base en los antecedentes mencionados (en relación a que disminuciones en el vigor de la semilla ó fenómenos de estrés sufridos por ella modifican la actividad ó la síntesis de esta enzima), que la producción de la actividad de α -amilasa es un mecanismo probable de adaptación de las semillas y por consiguiente, de la plántula al medio ambiente. En consecuencia, constituye una parte importante del vigor de la semilla.

El estudio de la producción de la actividad de α -amilasa en aleuronas aisladas de semillas deterioradas constituye un modelo importante para el conocimiento de la regulación de la síntesis de la α -amilasa y, al mismo tiempo, para ahondar en los efectos del deterioro en las semillas y en la respuesta de éstas a este fenómeno.

El objetivo de este trabajo, por ende, es el determinar por qué en semillas deterioradas se produce una menor actividad de α -amilasa. Con el propósito de alcanzar dicho objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1) La selección del material biológico a utilizar. Se seleccionó como material de estudio a semillas de trigo (*Triticum aestivum*) var. Tonichi, las cuales ofrecen la ventaja, como todos los cereales, de poder separar físicamente el fenómeno de movilización de reservas del de la viabilidad de la semilla, mediante la

disección del embrión de éstas, además de lo anterior, los cereales son resistentes al deterioro por lo que es posible graduar el deterioro a producir sobre las semillas.

2) La producción de un lote deteriorado y otro control. En el desarrollo de este trabajo, se deterioró un lote de estas semillas, y otro no (Lote control), caracterizándose ambos lotes en relación a su vigor.

3) Caracterización del funcionamiento de las aleuronas de semillas control y deterioradas. Se estudiaron algunas funciones de las aleuronas aisladas tanto de semillas control como deterioradas, tales como: la capacidad de acidificación, la capacidad de síntesis de proteínas. Se determinó también, i) la actividad de α -amilasa producida por las dos clases de aleuronas, ii) la composición de isoenzimas de α -amilasa producidas, iii) la inducción de la actividad de esta enzima en función del tiempo, iv) la sensibilidad de aleuronas control y deterioradas a el AGe.

MATERIALES Y METODOS.

a) Procedimiento para el deterioro de las semillas.

Para la realización de este trabajo se utilizaron semillas de trigo *Triticum aestivum*, var. Tonichi. Un lote de estas semillas se dividió en dos partes, una (Lote 1) se almacenó a 4 °C por seis meses en un frasco de vidrio con tapón de rosca y "muñecas" de sílica gel, la otra parte, Lote 2, se almacenó por el mismo lapso de tiempo a temperatura ambiente también en un frasco de vidrio con tapón de rosca, sin sílica gel.

Al término de los seis meses se realizaron las pruebas que a continuación se mencionarán, almacenándose después los dos lotes a 4 °C con sílica gel durante la realización del presente trabajo.

b) Determinación del porcentaje de germinación acumulado.

Se sembraron 50 semillas tanto del Lote 1 ó control y 50 semillas del Lote 2 ó deteriorado, en "tacos" por triplicado según lo reportado por Moreno, (41). Para ello se humedecieron toallas de papel donde se colocaron a razón de 50 semillas por "taco", una vez hecho esto se enrollaron y se almacenaron en un recipiente de plástico con agua y una rejilla de plástico sobre la que se depositaron los tacos, de manera que no estuvieran en contacto directo con el agua. Se almacenaron los recipientes en una estufa a 25 °C, y cada 24 horas se revisaron para contar a las semillas cuya raíz hubiera protuído, siendo esto equivalente a las semillas germinadas.

c) Determinación de la acumulación de peso seco.

Se sembraron 25 semillas del Lote 1 o control y 25 semillas del lote 2 ó deteriorado en agrolita por triplicado, con iluminación natural y a temperatura ambiente. Se regaron cada 24 horas con agua desionizada y se cosecharon las plántulas a los 4, 5, y 6 días después de haber sido sembradas. Al cosecharse se separó el endospermo de la radícula y coleóptilo, depositándose por separado en frascos de vidrio. Se secaron en una estufa a 100 °C por 3 días según lo recomendado por Moreno (41). Al término de este tiempo se pusieron en un desecador de vidrio hasta que se enfriaron,

pesándose después en una balanza analítica Mettler.

d) Inducción de la actividad de α -amilasa en aleuronas aisladas.

Primeramente se separó el embrión del resto de la semilla con un bisturí desechándose el embrión. El resto de la semilla se lavó durante 20 min. con solución comercial de hipoclorito de sodio (Cloralex) al .8% agitándose constantemente el recipiente en el cual se colocaron las medias semillas.

Posteriormente, se lavaron dentro de una campana de flujo laminar en condiciones estériles, tres veces con agua desionizada estéril y se colocaron para su imbibición en cajas de Petri con 2 papeles filtros Whatman del número 1 previamente esterilizados, a razón de 50 medias semillas por caja de Petri, se agregaron 5 ml. de agua desionizada estéril y se sellaron las cajas con Parafilm guardándose por 24 horas en una estufa a 25 °C.

Al término de este tiempo, se aislaron las aleuronas presionando las medias semillas con una espátula, eliminándose el almidón de la media semilla quedando únicamente la capa de aleurona y la testa de la semilla.

Posteriormente 20 aleuronas se incubaron en condiciones de esterilidad, en 5 ml. de ácido succínico 20 mM pH 4.0, cloruro de calcio 20 mM y con o sin ácido giberélico 1×10^{-5} M, a 25 °C y con agitación de 150 rpm en una incubadora de temperatura controlada New Brunswick Sci. Co., Inc. Edison, por 24, 36 y 48 horas.

e) Extracción de la actividad de α -amilasa.

Al término de los tiempos mencionados, se ajustó a 6.0 el pH del medio de incubación con una solución de KOH 1 M y se homogenizaron las aleuronas en un mortero con arena de mar y 1 ml de cloruro de sodio 0.2M, al homogenado se le agregó el sobrenadante del medio de incubación y se calentó a 65 °C por 20 min. Posteriormente, se centrifugó a 2000 X g a 4 °C por 10 min, decantándose después el sobrenadante, que constituye el extracto para la medición de la actividad de α -amilasa. Este extracto o bien se utilizó inmediatamente o se guardó a -20 °C.

f) Medición de la actividad de α -amilasa.

Esta se realizó según el método reportado por Varner y

Chrispeels(63) con algunas modificaciones que a continuación se detallan. Para ello se utilizó almidón soluble como sustrato, el cual se preparó de la siguiente manera: 0.125 gr de almidón se calentaron a ebullición por minuto y medio con 5 ml de agua desionizada, posteriormente se le agregó 0.25 ml de acetato de calcio 1.3 M pH 6 y 0.25 ml de cloruro de sodio 0.1 M, se aforó a 50 ml con agua desionizada y se centrifugó a 3000 rpm, se colectó el sobrenadante mismo que se utilizó como sustrato para la medición de la actividad de α -amilasa.

El reactivo de yodo se preparó con yoduro de potasio al 6% p/v y yodo metálico resublimado 0.6% p/v. En el momento de realizar el ensayo de determinación de la actividad de α -amilasa, se elaboró una solución 1% v/v de yodo en ácido clorídrico 0.05 M.

Para la determinación de la cantidad de sustrato a utilizar, se tomaron 0.2 ml de la solución de almidón y se agregó la cantidad de agua desionizada suficiente para 4 ml y 2 ml de la solución de yodo. Se midió la absorbencia a 620 nm en un espectro Sequoia-Turner (Modelo 340) de esta mezcla, contra un blanco preparado con 4 ml de agua y 2 ml de la solución de yodo, si la absorbencia era menor de 1.0 se elevó la cantidad de almidón a utilizar, hasta que este parámetro fuera cercano a 1.0.

Para el ensayo de actividad, se agregó la cantidad de almidón elegida y un volumen inicial de 100 μ l de extracto enzimático, se agitó y al cabo de 3 min se agregaron 2 ml de la solución de yodo para detener la reacción, se aforó después a 6 ml. con agua desionizada.

Si la diferencia de absorbencia entre este tubo y la mostrada por el tubo con solo almidón (Blanco), en el que se eligió la cantidad de almidón a utilizar era menor de 0.5, entonces se disminuyó o bien el tiempo del ensayo o la cantidad de enzima a utilizar, hasta que esta diferencia fuera menor de 0.8 y mayor de 0.5.

El cálculo de la actividad de α -amilasa se hizo como sigue:

Actividad de la enzima por minuto: $\frac{\text{Absorbencia del Blanco} - \text{Absorbencia de la Muestra}}{\text{Tiempo}}$

Actividad de α -amilasa por 20 alveonas por min.: $\frac{\text{Actividad por min.} \times \text{vol. total del ensayo}}{\text{vol. total de la muestra} / \text{Cantidad de muestra ensayada}}$

g) Determinación de la cinética de acidificación.

Se imbibieron medias semillas control y deterioradas 24 horas en las condiciones ya mencionadas, las aleuronas se aislaron después de este tiempo de la manera ya expuesta y se incubaron en matraces de 50 ml, 10 aleuronas por cada 5 ml de un medio que consistía en ácido succínico 5 mM pH 5.8 y con una agitación de 150 rpm a 25 °C, en una agitadora de temperatura controlada por 2, 4, 6, 8, 15, 18, 21 y 24 horas. Al término de los tiempos mencionados se midió el pH del medio con un electrodo de pH Conductronic.

h) Elaboración de zimoqramas en geles de electroenfoque.

La solución de acrilamida/bisacrilamida para estos geles se preparó con 9.7% p/v de acrilamida y .3 % p/v de bisacrilamida, la solución se filtró 2 veces con papel filtro Whatman del número 1, y después se filtró por filtros Millipore de 45 μ hasta que el filtro quedara limpio. Esta solución se guardó a 4 °C.

Asimismo, se preparó la solución del ánodo la cual consistía en ácido fosfórico (H_3PO_4) 0.5 M, pH 3.0.

La solución del cátodo era etilendiamina monohidratada 0.01 M, pH 10.

Tanto la solución del cátodo como la del ánodo se desgasificaron por lo menos media hora antes de ser utilizadas.

Se preparó también una solución de sobremuestra con glicerol al 5%, anfolinas de un rango de pH de 3 a 10 al 1% v/v.

La solución de muestra consistía en glicerol al 10%, anfolinas de rango de pH de 3 a 10 al 1% v/v y β -mercaptoetanol al 2%.

La solución de persulfato de sodio se preparó al 3%.

En este tipo de geles no se utilizó gel concentrador, por lo que se preparó un solo gel con carriles con los reactivos ya mencionados en las siguientes concentraciones finales v/v:

La solución de acrilamida/bisacrilamida al 50%, glicerol al 17%, anfolinas de rango de pH de 3 a 10 al 5.5%, anfolinas de rango de pH de 4 a 6 al 1.35%. Esta mezcla se desgasificó por lo menos 15 min y después se agregó la solución de persulfato de sodio al 1% y TEMED al .1%. Esta solución se vertió en la placa de electroforesis. En los carriles se colocó solución de sobremuestra. Las anfolinas del rango de pH de 3 a 10 fueron de

marca comercial LKB y las de 4 a 6 fueron marca Sigma.

El gel se recorrió sin muestras ya sea a 1 Watt o bien a 250 volts durante 1.15 h a una temperatura de 10 °C, con el objeto de que se formara el gradiente de pH.

Posteriormente, se colocaron las muestras con solución de muestra en los carriles y se agregó encima de ellas la solución de sobremuestra. Se desechó la solución del cátodo y se utilizó solución del cátodo fresca. El gel se corrió posteriormente a 1 Watt por 2.5 horas o bien por el mismo lapso pero de la siguiente manera:

300 volts 30 min.

360 volts 30 min.

420 volts 30 min.

480 volts 30 min.

540 volts 60 min.,

a 10 °C. Al término de la corrida se sacó el gel y se separó un carril del mismo sin muestra, se cortó en fracciones de 1 cm, las cuales se colocaron en tubos de ensaye con 1 ml de agua desionizada, determinándose inmediatamente el pH de la solución de estos tubos con un electrodo de pH.

El resto del gel se imbibió en una solución de almidón al 0.5%, preparándose de la siguiente manera: 0.5 g de almidón con 10 ml de agua desionizada se calentaron a ebullición por 3 min, al término de este tiempo se aforó la solución a 100 ml con agua desionizada. El tiempo de imbibición del gel fue de 1 hora con agitación constante a temperatura ambiente.

Posteriormente, se desechó la solución de almidón y se le agregó a el gel una solución de acetato de calcio 0.05 M pH 6, y se incubó a 50 °C por 15 min, al término del tiempo estipulado se desechó la solución de acetato de calcio y se detuvo la reacción con un solución de yodo (40% p/v de yoduro de potasio y 2.5% p/v de yodo resublimado), 0.5% en una solución de HCl 0.05 M.

i) Determinación de la capacidad de síntesis de proteínas.

Se imbibieron medias semillas control y deterioradas y se aislaron las capas de aleurona en las condiciones ya mencionadas, posteriormente se incubaron 20 aleuronas en 5 ml del medio de incubación con ó sin AGs 1×10^{-5} M, por 24, 36 y 48 horas. Una

hora antes de que finalizara el tiempo de incubación se desechó el medio y se agregaron 2 ml de medio fresco más 30 μ Ci de 35 S-Metionina, se incubaron por una hora más y al término de este tiempo fueron homogenizados en un mortero con arena de mar y 1 ml del siguiente medio: 1% de β -mercaptoetanol, 10% de glicerol, 0.125 M de Tris-HCl pH 6.8, leupeptina 100 mM y 1 mM de metionina. A continuación se centrifugó el homogenado en una microfuga a 10000 rpm por 2 min, decantándose el sobrenadante para ser utilizado para la determinación tanto de captación de radioactividad como para la incorporación de radioactividad a proteína precipitable por TCA.

Con respecto a la primera determinación, se colocaron 10 μ l del sobrenadante de la homogenización en un filtro de papel Whatman de 10 cm de diámetro, se secaron con una pistola de aire y se contaron en viales con 5 ml de líquido de centelleo Aquasol (NEN), por 3 min en un contador de centelleo Minaxi β -Tric-Carb 4000. Con respecto a la segunda determinación se colocaron 10 μ l del homogenado en filtros como en el caso anterior y se les dió el siguiente tratamiento:

Se sumergieron en TCA al 10% a 4 °C por 10 min, se utilizaron 5 ml de la solución por cada filtro en este caso y en los siguientes.

Se sumergieron después en TCA al 5% a 4 °C por 5 min.

Se hirvieron después en TCA al 5% por 30 min.

Se lavaron sucesivamente con TCA al 5% a 4°C.

Se lavaron varias veces con etanol-éter 1 a 1 v/v

Se lavaron con éter a 4°C.

Se secaron los filtros con pistola de aire y se colocaron en un vial con 5 ml de líquido de centelleo Aquasol y se contaron en las mismas condiciones que en la determinación anterior.

j) Electroforesis en geles en placa en condiciones desnaturalizantes.

Esta se realizó por el método reportado por Laemmli (35), utilizándose una solución patrón de acrilamida 30% y de bisacrilamida 0.8%, que en el gel separador se utilizó al 10% y en el gel concentrador al 5%, la mezcla del gel separador se preparó con Tris-NaOH pH 8.8 0.375 M y SDS 0.1% se desgasificó y posteriormente se agregó persulfato de sodio al 1% y TEMED al

0.1%. El gel concentrador se preparó con la solución de acrilamida/bisacrilamida al 5%, Tris-NaOH pH 6.8 0.041 M, SDS 0.03%, persulfato de sodio 1% y TEMED al 0.1%.

La solución de muestra se preparó con Tris-NaOH pH 6.8 0.06 M, azul de Bromofenol 0.004%, SDS 0.1% , glicerol 20% v/v, 2% de β -mercaptoetanol.

La solución de los reservorios del gel se preparó con Tris-HCl 0.019 M, glicina 0.15 M, y SDS al 1%, pH 8.8.

Las placas se corrieron a 100 volts por 1 hora y a 150 volts por 4 horas. Al final de este tiempo, el gel se trató de la siguiente manera con el propósito de efectuar una fluorografía del mismo:

Se fijó en 300 ml de una solución de ácido acético al 10% y etanol absoluto al 30% v/v por una hora ó por toda la noche con agitación, al término de este tiempo se desechó la solución y se agitó el gel en una solución cuyo volumen es 3 veces el volumen del gel, de 55% v/v de ácido acético, 0.4% de PPD peso/volumen, 15% v/v de etanol absoluto y 30% v/v de xileno, por una hora; finalizando este tiempo se lavó el gel con 600 ml de agua desionizada por media hora 2 veces.

k) Inmunoprecipitación de α -amilasa.

Para ello se tomaron 20, 40, 60 y 80 μ g de proteína determinada por el Método de Bradford (5) de los homogenados de aleuronas control y deterioradas incubadas en presencia de 30 μ Ci de 35 S-Metionina por 24, 36 y 48 horas, y se les agregó anticuerpo anti- α -amilasa a una dilución 1:10 incubándose ó no las muestras a 37 °C por dos horas, guardándose después a 4 °C por 12 horas. Al término de este tiempo se determinó la actividad en el sobrenadante de cada incubación, los precipitados de estas incubaciones se sometieron posteriormente a una electroforesis desnaturalizante. Los resultados de este experimento que se muestran en la tabla A indican que, con una concentración de proteína de 60 μ g y con incubación por 2 horas a 37 °C, se precipita la mayor cantidad de actividad presentada en el sobrenadante (96%).

l) Determinación de la cantidad de radioactividad recuperada después de un pulso de radioactividad.

20 aleuronas control y deterioradas se incubaron en matraces de 60 ml con el medio y en las mismas condiciones del experimento del inciso i, pero por tiempos diferentes. Se incubaron 2 matraces con ácido giberélico de cada tipo de aleuronas, por 35 horas, al término de este tiempo se les agregó 30 μ Ci de 35 S-Metionina incubándose por una hora más. Posteriormente, las aleuronas de un matraz se procesaron como en el inciso i y se realizaron las determinaciones descritas en este inciso; las aleuronas de otro matraz se lavaron con medio de incubación fresco y se incubaron sin agregarse marca radioactiva por 4 horas más. Al término de este lapso aleuronas se homogenizaron y se realizaron las determinaciones descritas de la manera antes mencionada. Asimismo, se aplicaron en un gel desnaturalizante estas muestras y se realizó también una fluorografía aplicando la técnica ya descrita en el inciso (i).

n) Determinación de la Capacidad de Acidificación de aleuronas control y deterioradas en presencia de Glucosa.

20 aleuronas control y deterioradas se incubaron en 5 ml ya sea de agua desionizada o de agua más 50 mM de glucosa con agitación a 150 rpm y a 25 °C y por 2, 4, 6, y 8 horas. Al finalizar estos tiempos se determinó el pH del medio con un electrodo de pH.

TABLA A.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION ADECUADA PARA OBTENER LA MAXIMA PRECIPITACION DE α -amilasa.

DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROTEINA DE UN HOMOGENADO DE ALEURONA + SOBRENADANTE, SE PUSIERON A PRECIPITAR CON UNA DILUCION 1:10 DE ANTICUERPO ANTI- α -amilasa, A 4°C POR 15 HORAS, PREVIA INCUBACION O NO A UNA TEMPERATURA DE 37°C POR DOS HORAS, AL TERMINO DEL TIEMPO ESTIPULADO SE CENTRIFUGARON LAS MUESTRAS A 10000 RPM POR 5 MIN, RESUSPENDIENDOSE EL PRECIPITADO EN 30 μ L DE UNA SOLUCION .2 M DE NaCl, MISMO QUE SE APLICO A UN GEL DE SDS PARA DETERMINAR LA MAXIMA CANTIDAD DE PROTEINA PRECIPITADA. POR OTRA PARTE, SE MIDIO LA ACTIVIDAD DE α -AMILASA DEL SOBRENADANTE QUE NO PRECIPITO.

Concentracion de proteína (μ g)	Calentadas a 37 °C.	Sin calentar
* Actividad de α -amilasa precipitada (%)		
20	91	89
40	81	73
60	96	43
80	34	39

*= Unidades de α -amilasa por 20 aleuronas.

RESULTADOS

a) Determinación de la calidad de la semilla.

Para la caracterización de la calidad fisiológica de la semilla se determinó la germinabilidad (viabilidad) y el vigor de la misma.

El vigor se midió determinando la velocidad de germinación y la acumulación de materia seca en plántulas de los dos lotes de semilla (41). En la Fig. 1, se muestra el resultado de la medición del porcentaje de germinación acumulado por estos lotes a diferentes tiempos, (velocidad de germinación), donde se observa que la germinabilidad presentada por ambos lotes es mayor del 92%. Sin embargo el lote 2 presenta una menor velocidad de germinación en comparación con el lote 1, ya que el t_{50} (lapso en el que germina la mitad del lote) de las semillas del lote 1 es de 26 horas mientras que el del lote 2 es de 45 horas.

Asimismo, se observa una menor sincronía al germinar en las semillas del Lote 2 (deteriorado) que en las del lote 1 (control): en el primero una pequeña proporción de las semillas germina a las 24 horas, la mayoría lo hace a las 48 y otra pequeña proporción de semillas germina a las 72 horas, mientras que en el lote 1, la mayoría de las semillas germinan entre 24 y 48 horas. Por lo tanto, ambos lotes poseen una viabilidad semejante pero una velocidad de germinación diferente, siendo ésta menor para el lote 2 que para el lote 1.

En consecuencia, cabe señalar que las posibles diferencias que se puedan encontrar entre estos dos lotes de semillas en los parámetros determinados en este trabajo, no son debidas a que en un lote se tienen semillas no viables (muertas) y en otro semillas viables, sino a las diferencia de vigor de las semillas de uno y otro lote.

A continuación se determinaron otros parámetros del vigor como son: la disminución de peso seco en endospermos del lote 1 y 2 y la acumulación de peso seco en plántulas de los dos lotes. En la Fig. 2A se muestra que la velocidad de movilización de reservas es mayor en las semillas control que en las deterioradas, como lo indica el hecho de que el peso seco de los endospermos de semillas controles disminuye en 0.19 mg/día, mientras que en el deteriorado

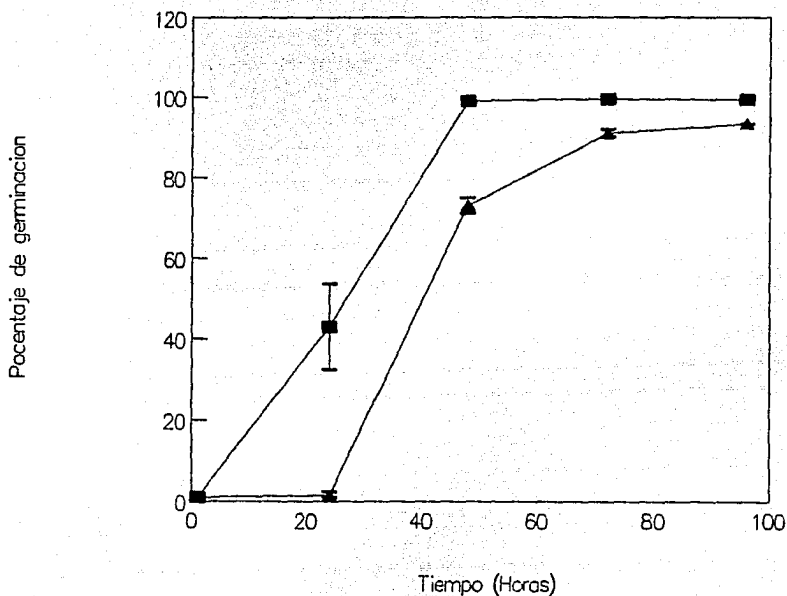


FIG. 1. PORCENTAJE DE GERMINACIÓN ACUMULADO CON RESPECTO AL TIEMPO DE SEMILLAS CONTROL Y DETERIORADAS. Se sembraron 50 semillas control y deterioradas en *tacos* con triplicado a 25 °C. Cada 24 horas se contaron las semillas germinadas, esto es, aquellas cuya raíz hubiera protruido.

■. LOTE 1 (Control), ▲ LOTE 2 (Deteriorado).

Fig. 2

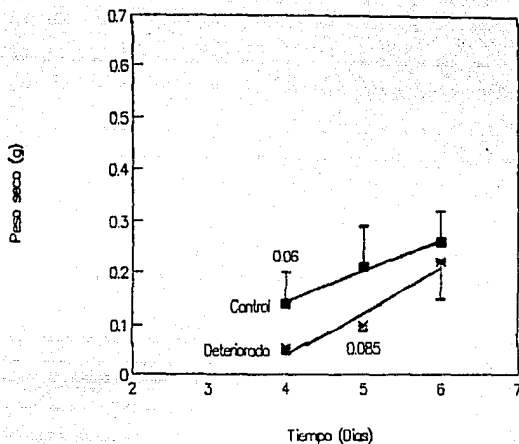
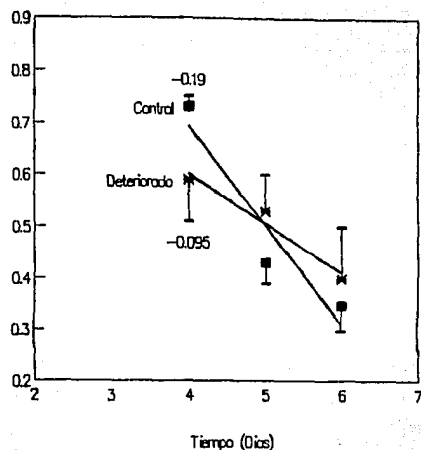


FIG. 2. ACUMULACION DE PESO SECO EN PLANTULAS DE SEMILLAS CONTROL Y DETERIORADAS. Se sembraron lotes de 25 semillas control y deterioradas en agrolita por triplicado, a temperatura ambiente e iluminación natural. Se cosecharon a los tiempos indicados, separando el endospermo (A) de la radícula y coleóptilo (B) mientras que se colocaron en tréscos de vidrio para secarse en un horno a 100°C por 3 días, pesándose una vez enfriados en un desecador. Las líneas se calcularon por medio de regresión lineal. Los números indican la pendiente de las mismas.

disminuye sólo 0.095 mg/día.

De acuerdo con el dato anterior, la acumulación de peso seco es significativamente mayor ($\alpha = 0.05$) en plántulas controles que en las deterioradas (Fig. 2B). Los datos de esta figura, también indican que la velocidad de asimilación es mayor en plántulas deterioradas que en las control. Las primeras incrementan su peso seco en 0.085 g/día en tanto que las control lo hacen a razón de 0.06 g/día. Los resultados anteriores demuestran que el vigor de los lotes 1 y 2 es diferente, siendo mayor en el primero que en el segundo. En lo sucesivo se considerará en forma indistinta lote 1 control ó de alto vigor y lote 2 deteriorado ó de bajo vigor.

b) Determinación de la capacidad de acidificación de aleuronas deterioradas y controles.

Una de las funciones reportadas de la capa de aleurona de semillas de trigo, además de la síntesis y/o secreción de enzimas hidrolíticas, es la capacidad de acidificar el endospermo almidonoso, siendo esta función independiente de la acción del ácido giberélico (20).

En la gráfica de la Fig. 3 se observa que las aleuronas controles y deterioradas siguen una cinética similar de acidificación. Sin embargo, la disminución del pH lograda por las aleuronas control es mayor que la obtenida en el caso de las aleuronas deterioradas. Este último resultado indica una disminución de la capacidad de acidificación de la aleurona por el deterioro. Tal disminución puede incidir a su vez en otra de las funciones de la aleurona (la síntesis de α -amilasa), ya que la acidificación del medio probablemente contribuya a la solubilización del ión Ca^{++} (35), el cual participa en la regulación de la síntesis de α -amilasa junto con el AG_3 (29).

Como ya ha sido mencionado en la Introducción (Actividad de α -amilasa y su relación con el vigor), la disminución del vigor en semillas de trigo ocasiona, entre otros efectos, una disminución de la actividad de la enzima α -amilasa (46) medida en semillas completas (59) ó como actividad de α -amilasa secretada al medio (1). Estos resultados pueden explicarse por una disminución en la producción de AG_3 por el embrión de la semilla ó por una menor

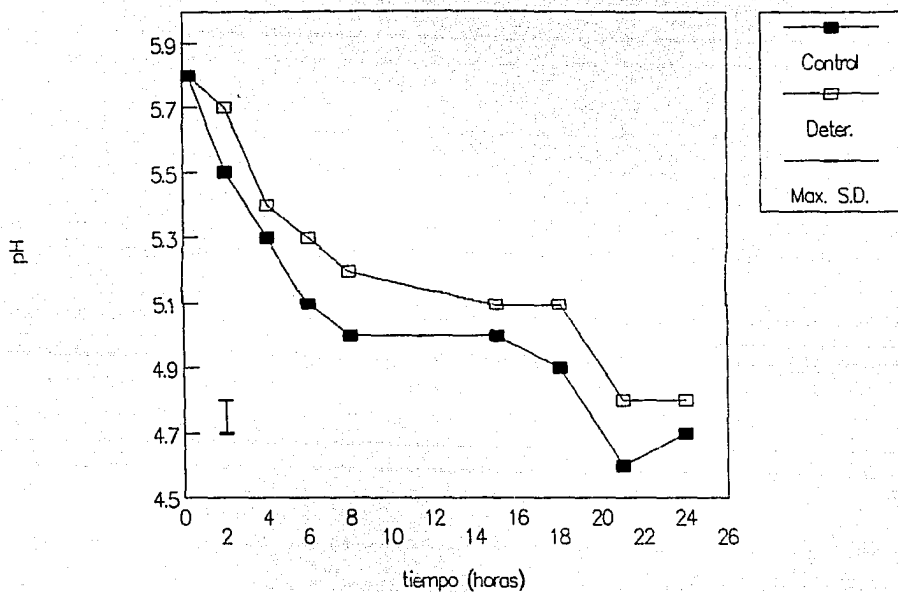


FIG. KINETICA DE LA CAPACIDAD DE ACIDIFICACION DE ALEURONAS CONTROL Y DETERIORADAS. 10 aleuronas control y deterioradas se incubaron por 24 horas en 2 ml. de ácido succínico 5 mM pH 5.8, CaCl₂ 20 mM, a 25 °C, con agitación de 150 rpm. Al término del tiempo asociado se determinó el pH del medio de incubación. Se muestra la máxima desviación estándar obtenida.

secreción de la enzima activa por la capa de aleurona deteriorada, ó bien por una diferente sensibilidad de la aleurona de bajo vigor a el AG₃.

Con el fin de clarificar estos aspectos, en el presente trabajo se determinó la actividad de α -amilasa secretada al medio y la que se encuentra dentro del tejido producida por la incubación de las aleuronas control y deterioradas con igual concentración de AG₃ (1×10^{-5} M) y al mismo pH, siendo éste de 4.0. Al mismo tiempo, se midió la producción de esta actividad en el transcurso del tiempo, así como la sensibilidad de los dos tejidos al AG₃.

c) Inducción de la actividad de α -amilasa en aleuronas control y deterioradas a diferentes tiempos.

Se determinó la actividad de α -amilasa incubando aleuronas aisladas de semillas control y deterioradas en medios con y sin AG₃ (ver Materiales y Métodos), por 24, 36 y 48 horas. Al término de estos tiempos se midió la actividad de α -amilasa total producida (Tabla I).

Los resultados obtenidos muestran que en aleuronas control la actividad de α -amilasa acumulada en presencia de AG₃ se incrementa a medida que aumenta el tiempo de incubación, mientras que en aleuronas deterioradas la máxima acumulación se detecta a las 36 horas de incubación y permanece constante. A las 36 horas las actividades enzimáticas son similares en aleuronas control y deterioradas, por el contrario, a las 48 horas la aleurona control produce 2 veces más actividad de α -amilasa que las deterioradas, presentándose durante este tiempo la mayor diferencia en la actividad de α -amilasa producida por los dos tejidos.

Los resultados anteriores podrían deberse a que la aleurona deteriorada posee diferente sensibilidad al AG₃ ó bien a que su capacidad de sintetizar proteínas esta disminuida. Ambas posibilidades se exploraron en este trabajo.

ACTIVIDAD DE α -AMILASA EXTRAIDA DE ALEURONAS AISLADAS DE SEMILLAS
CONTROL Y DETERIORADAS INCUBADAS POR 24 36 Y 48 HORAS.

20 ALEURONAS FUERON INCUBADAS EN 5 ML DE UN MEDIO CON AG_9 $1 \times 10^{-5} M$, $CaCl_2$ 20 mM, ACIDO SUCCINICO 20mM, pH 4.0 POR 24,36 y 48 HORAS A 25 °C, EN MATRACES ERLERMAYER DE 50 mL CON AGITACION DE 150 rpm, AL TERMINO DEL TIEMPO ESTIPULADO SE DETERMINO LA ACTIVIDAD DE α -AMILASA.

<i>Tiempo de inducción. (horas)</i>	24	36	48
<i>+AG₉</i>	70 [±] 24*	126 [±] 9	212 [±] 5
<i>Control</i>			
<i>-AG₉</i>	10 [±] .4	9 [±] 6	4 [±] .6
<i>+AG₉</i>	36 [±] 8	120 [±] 9	100 [±] 3
<i>Deteriorada</i>			
<i>-AG₉</i>	15 [±] .7	10 [±] 2	3 [±] 2

UNIDADES DE α -AMILASA POR 20 ALEURONAS.

*Una unidad de α -amilasa es la cantidad de enzima que produce el cambio de una densidad óptica.

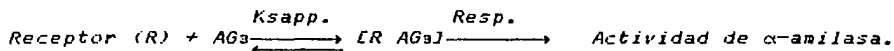
d) Determinación de la sensibilidad a ácido giberélico en aleuronas control y deterioradas.

En el experimento de las Figuras 4 y 5, donde se incubó aleuronas control y deterioradas a diferentes concentraciones de AG_9 a pH 4 a 25 °C por 24 y 48 horas, se observó que tanto la aleurona control como la deteriorada presentan una respuesta semejante a la variación de la concentración del ácido giberélico a las 24 horas y también similar a la reportada por varios autores característica de las aleuronas (23). Ambos tejidos muestran una inducción creciente de la actividad de α -amilasa conforme se aumenta la concentración de AG_9 , hasta alcanzar un *plateau* de acumulación de actividad enzimática.

El modelo de Hill ha sido utilizado para determinar la afinidad de los receptores por su ligando (K_s app), midiendo la unión de una hormona radioactiva a el receptor, ó bien la magnitud de la respuesta metabólica producida. Mediante este modelo también es posible conocer el número de receptores y el tipo de cooperatividad en la unión del ligando a los receptores a través del número de Hill obtenido (12).

Los datos de las actividades de α -amilasa obtenidas a diferentes concentraciones de AG_9 (consideradas como la Respuesta al estímulo de la fitohormona), se ajustaron al modelo de Hill por regresión no lineal.

Los resultados obtenidos a las 24 horas de incubación responden al modelo de Hill, siempre que se tome en cuenta la variabilidad inherente al modelo experimental. En nuestro experimento el esquema general del fenómeno medido sería el siguiente:



A las 48 horas de incubación, en cambio, los resultados obtenidos son claramente inconsistentes con el modelo de Hill. Dado que la síntesis de α -amilasa se inicia entre las 12 y 15 horas de incubación en presencia de AG_9 (17) es probable que durante la incubación una parte importante de la actividad se pierda debido al recambio propio del péptido. Por lo tanto, las actividades enzimáticas medidas a las 24 horas reflejan una contribución menor

de este último factor que a las 48 horas. Esto último explicaría la imposibilidad de ajustar las curvas a las 48 horas de incubación al modelo de Hill.

A las 24 horas de incubación la sensibilidad de ambos tejidos al fitorregulador es similar (Fig. 4), ya que las constantes de disociación aparentes, calculadas mediante ajuste por regresión no lineal al modelo de Hill, no son significativamente diferentes para un $\alpha = .05$, $4.0 \pm 2.6 \times 10^{-9}M$ para el control, $7.9 \pm 3.5 \times 10^{-9}M$ para el deteriorado. Tampoco se aprecian diferencias significativas en cuanto al coeficiente de Hill aparente (0.38 ± 0.20 para el control, 0.86 ± 0.27 para el deteriorado, $\alpha = 0.05$), estos valores indican que probablemente existen 2 receptores con diferente afinidad a AGs o bien que, hay un receptor con 2 sitios de unión a este fitorregulador, cuya unión presenta cooperatividad negativa. diferencia de lo anterior, la respuesta máxima calculada si es significativamente diferente (67.0 ± 6.7 unidades de α -amilasa/20 aleuronas para el control, 37.8 ± 5.3 unidades de α -amilasa/20 aleuronas para el deteriorado, $\alpha = 0.05$). A tiempos mayores de inducción, 48 horas (Fig. 5), solamente con la forma de las curvas obtenidas, puede suponerse que las diferencias persisten a nivel de la respuesta máxima de actividad acumulada, en tanto que la sensibilidad parece ser semejante en las dos clases de tejidos y mayor a la presentada a las 24 horas. Estas observaciones no son susceptibles de confirmarse en forma cuantitativa, puesto que como se ha señalado, los datos obtenidos no se ajustan al modelo de Hill a este tiempo de incubación.

Con base en estos resultados se postula que la sensibilidad de las aleuronas deterioradas al AGs no se encuentra modificada, por lo que la menor actividad de α -amilasa producida por estas aleuronas no se debe a una insuficiente cantidad adicionada de ácido giberélico, sino probablemente a una respuesta a AGs diferente en las mismas, como se observó a las 24 horas de incubación.

Como ya se ha mencionado en la Introducción, existen dos grupos de isoenzimas de α -amilasa, las de Alto Punto Isoeléctrico y las de Bajo Punto Isoeléctrico. Dado que la actividad de esta enzima medida colorimétricamente diferencia entre la actividad de cada uno de estos grupos, no es posible saber si la baja actividad

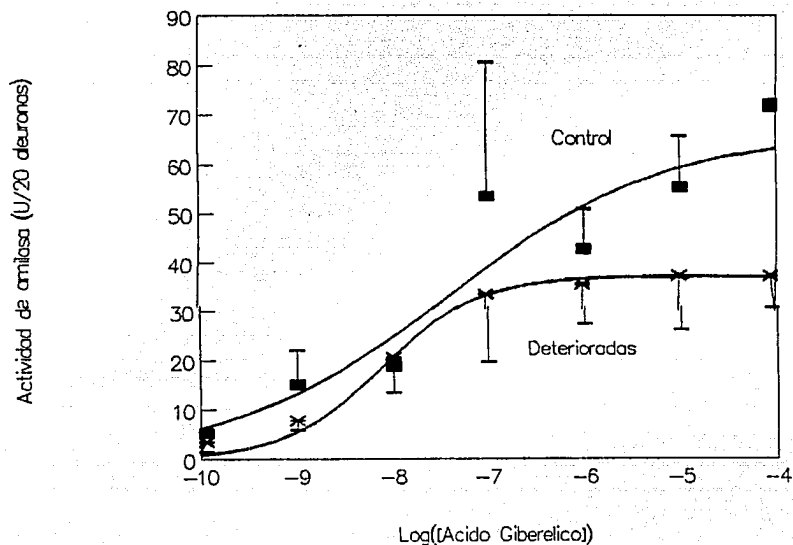


FIG. 4. CURVA DOSIS-RESPUESTA DE ALEURONAS DE SEMILLAS CONTROL Y DETERIORADAS AL ACIDO GIBERELICO. Se incubaron 20 aleuronas de semillas control y deterioradas en matraces Erlenmayer de 50 ml. en 5 ml. de Ac. Succinico 20 mM pH 4.0, CaCl_2 20 mM y las concentraciones de AG+ arriba indicadas por 24 horas a 25 °C, agitándose a 150 rpm. Al término de este tiempo se homogenizaron los tejidos mezclándose con el sobrenadante de la incubación, para la determinación de la actividad de α -amilasa según lo indicado en Materiales y Métodos. Las líneas son resultado de un ajuste al modelo de Hill por regresión no lineal.

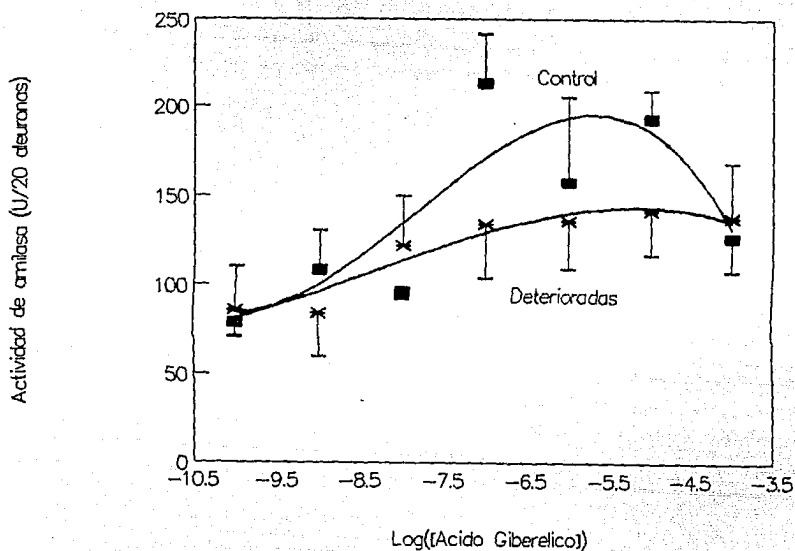


FIG. 5. CURVA DOSIS-RESPUESTA DE ALEURONAS AISLADAS DE SEMILLAS CONTROL Y DETERIORADAS AL ACIDO GIBERELICO. Se incubaron 20 aleuronas de semillas control y deterioradas en las mismas condiciones indicadas en la Fig. 4, pero incubadas por 48 horas, al término de este tiempo se homogenizaron los tejidos maciándose con el sobrenadante de las incubaciones para la determinación de la actividad de α -amilasa. Las líneas son resultado de un ajuste a un polinomio de tercer grado. Estas curvas no responden al modelo de Hill.

observada de α -amilasa producida por aleuronas deterioradas se debe a: i) que no se induzca la actividad de un grupo en particular de isoenzimas, ii) que la actividad de ambos grupos esté disminuida en forma similar, iii) a que exista un retraso en la aparición de la actividad de las isoenzimas como se ha reportado para isoenzimas de succinato deshidrogenasa en semillas de maíz de bajo vigor (46). Por ello se determinó la composición de isoenzimas de α -amilasa producida por aleuronas control y deterioradas.

e) Isoenzimas de α -amilasa en aleuronas control y deterioradas.

La presencia de cada uno de los grupos de isoenzimas se detectó por zimogramas en geles nativos de electroenfoque donde para cada caso se colocó 1 unidad de actividad (Fig. 7). En esta figura se observa que a todos los tiempos de inducción para los dos grupos de tejidos se detectan tres grupos de isoenzimas, uno que presenta un p.I. de 8.0 a 6.6, seguido de otro cuyo p.I. va de 6.4 a 5.5 y por último otro con p.I. de 5.4 a 5.0. El p.I. del segundo grupo se encuentra dentro de los reportados en la literatura para las isoenzimas de Alto p.I. (37,26), siendo el p.I. del primer grupo más alcalino que los p.I. de estas isoenzimas de Alto p.I.. En cambio el p.I. del tercer grupo sí está dentro de los puntos isoeléctricos reportados para el grupo de Bajo p.I. (37,26). La contribución a la actividad total de α -amilasa es mayor en las isoenzimas de p.I. intermedio (5.5 a 6.4) seguidas de las de Bajo p.I. (5.0 a 5.4) y por último de las de p.I. más alcalino (6.6 a 8.0).

En la Fig. 7 también se observa que el grupo de las isoenzimas de p.I. más alcalino en aleuronas deterioradas está formado por tres bandas, mientras que en aleuronas control se presentan 4. Lo anterior podría ser resultado de que la actividad de esta isoenzima sea muy baja ó de que no se esté sintetizando en forma apreciable.

Para determinar la cinética de inducción de las isoenzimas de aleuronas control y deterioradas, se efectuó un gel de electroenfoque en el cual se colocó el mismo volumen de extracto enzimático obtenido a los 3 tiempos de incubación de aleuronas

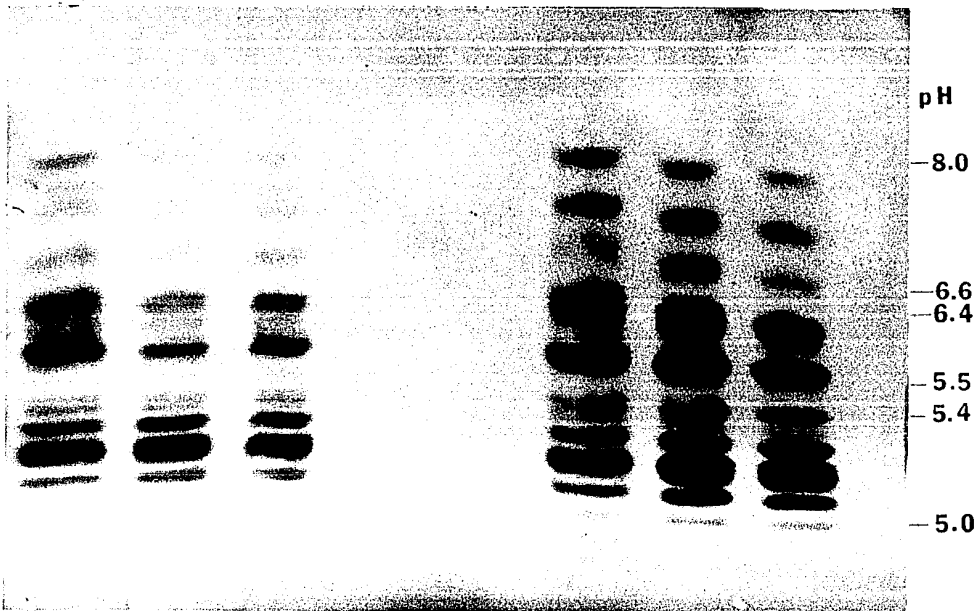


FIG. 7. ZIMOGRAMAS DE ISOENZIMAS CONTROL Y DETERIORADAS OBTENIDAS A 24, 36 Y 48 HORAS DE INDUCCION CON $1 \times 10^{-5}M$ DE Ag_2 . Se colocó en cada carril del gel de electroenfoque tanto para isoenzimas deterioradas y controles, como para los tres tiempos indicados, 1 unidad de actividad de α -amilasa. De izq. a derecha isoenzimas controles 40, 36 y 24. deterioradas 40, 36 y 24.

deterioradas y controles, independientemente de la actividad enzimática presentada. Los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 8, donde se observa que en el tejido control a las 24 horas la actividad de α -amilasa está constituida por la actividad de las isoenzimas de p.I. intermedio y por la de las de Bajo p.I.; a las 36 horas, se incrementa la actividad de estos dos grupos y aparece la actividad de las isoenzimas de p.I. alcalino. A las 48 horas de inducción, el patrón isoenzimático es muy similar al de las 36 horas, no obstante, se presenta una disminución en la actividad de las isoenzimas de Bajo p.I.

La cinética de aparición de las isoenzimas de aleuronas deterioradas es similar al de las control, sólo que la actividad enzimática presentada por las primeras es menor.

Los resultados anteriores muestran que se encuentra una actividad menor de los tres grupos de isoenzimas de α -amilasa provenientes de aleuronas deterioradas en comparación con las extraídas de aleuronas control, que la cinética de aparición de su actividad parece no ser diferente a la presentada por aleuronas controles y que hay una isoenzima inactiva o inexistente en las isoenzimas de p.I. alcalino del tejido deteriorado.

Lo anterior podría ser producto de una menor síntesis de las isoenzimas de α -amilasa en aleuronas deterioradas en comparación con las control, por estar disminuida la capacidad de síntesis de proteínas en la primera, como se ha reportado que ocurre en embriones de semillas deterioradas (46), ó en aleuronas sometidas a un *shock* de alta temperatura (11). Para abordar esta posibilidad se midió la capacidad de síntesis de proteínas en aleuronas control y deterioradas.

f) Determinación de la capacidad de síntesis de proteínas de aleuronas control y deterioradas.

La capacidad de síntesis de proteínas de aleuronas control y deterioradas se midió a través de la incorporación de ³⁵S-Metionina a proteína precipitable por TCA. Al mismo tiempo se determinó la cantidad de péptido de α -amilasa sintetizado mediante la precipitación del mismo con anticuerpos anti- α -amilasa. Estos experimentos se realizaron en presencia y ausencia de ácido

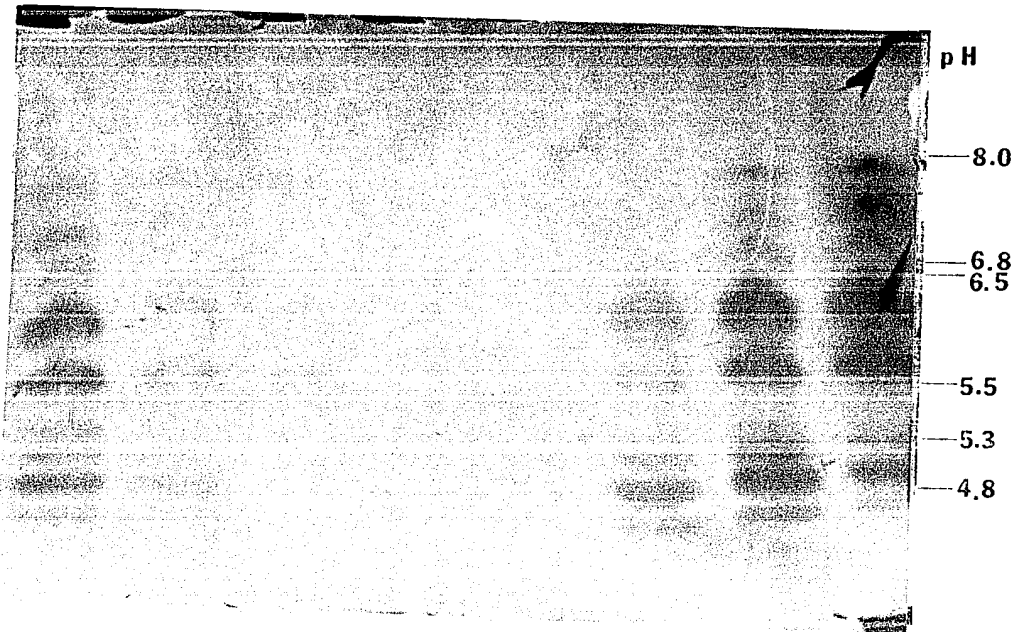


FIG. 8. ZIMOGRAMAS DE ISOENZIMAS CONTROL Y DETERIORADAS OBTENIDAS A 24, 36, Y 48 HORAS DE INDUCCION CON $1 \times 10^{-5} M$ DE Ag_2 . Se colocó en cada carril del gel de electroenfoque la misma cantidad de extracto tanto para el control como el deteriorado, misma que corresponde a 1 unidad de α -amilasa de la fracción más activa. De izq. a derecho: 0h, D36, D24, C24, C36 y C48 horas

giberólico, a 24, 36, y 48 horas de incubación.

En la Tabla II y III se muestran las medias de los resultados de tres experimentos realizados de manera independiente, a estas medias se les aplicó una prueba de análisis de varianza y los niveles de significancia se evaluaron mediante una prueba de Fischer, considerándose como significativas las diferencias encontradas en los parámetros determinados tanto entre tratamientos como entre tejidos, si éstas eran significativas a un $\alpha = 0.05$.

En la Tabla II en la cual se determinó la capacidad basal de síntesis de proteínas de aleuronas control y deterioradas (en ausencia de AGs), se observa primeramente que la Captación de ^{35}S -Metionina es semejante para ambos tipos de aleuronas a los tres tiempos determinados.

Lo mismo sucede respecto a las cpm precipitables por TCA y al porcentaje de incorporación de radioactividad a proteína; parámetros en los cuales no se encontró ninguna diferencia entre los tejidos ni entre los tiempos medidos.

En cuanto a la capacidad de síntesis de proteínas inducida por AGs en aleuronas control y deterioradas (Tabla III), se observa primeramente, que no existe ninguna diferencia significativa en la Captación de radioactividad entre aleuronas control y deterioradas en los 3 tiempos utilizados (Tabla III, columna 2).

En cuanto a las cpm incorporadas a proteína se observa que a las 48 horas, las aleuronas control incorporan significativamente más radioactividad a proteína en comparación con las aleuronas deterioradas (Tabla III, columna 3).

La capacidad de síntesis de proteínas del tejido se expresó como el por ciento de cpm incorporadas a proteína precipitable del total captado (Columna 4, III), y al determinar este parámetro en aleuronas deterioradas en presencia de AGs, se encontró que la capacidad de síntesis de proteínas del tejido deteriorado sólo es similar a la presentada por el tejido control a las 24 horas, siendo significativamente menor a tiempos posteriores (36 y 48 horas de inducción). En aleuronas control se observa que la capacidad de síntesis de proteínas se incrementa conforme al tiempo, siendo mayor a las 48 horas que a las 24 y 36, mientras que en aleuronas deterioradas esta capacidad parece permanecer

TABLA II

CAPACIDAD BASAL DE SINTESIS DE PROTEINAS DE ALEURONAS CONTROL Y DETERIORADAS.

20 aleuronas control y deterioradas fueron incubadas en el medio anteriormente descrito sin AGs, por 24, 36 y 48 horas. Una hora antes de completarse el tiempo estipulado, se lavaron las aleuronas y se incubaron por una hora en 2 ml de medio fresco con 30 μ Ci de 35 S-Metionina. al término de la hora, se eliminó el sobrenadante procesándose sólo las aleuronas. Se muestran las medias de los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros determinados en 3 experimentos realizados por separado.

Tejido	Captación (cpm)	cpm precipitables por TCA.	% de incorporación a proteína.
24 HORAS			
Control	7032333	1245366	18
Deter.*	7942500	1782866	22
36 HORAS			
Control	9035700	1820900	20
Deter.	7343533	1456600	20
48 HORAS			
Control	8392100	2453833	29
Deter.	10062633	2592433	26

*= Deteriorado.

TABLA III

CAPACIDAD DE SINTESIS DE PROTEINAS DE ALEURONAS CONTROL Y DETERIORADAS INDUCIDA POR Ag_3 .

Se incubaron las aleuronas control y deterioradas de la forma descrita en la tabla II, pero con Ag_3 a una concentración de 1×10^{-7} M. Se muestran las medias de los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros medidos en los tres experimentos efectuados por separado.

Tejido	Captación (cpm)	cpm precipitables por TCA	% de incorporación a proteína
24 HORAS			
Control	5798433	961533	17
Deter.*	5102233	720266	14
36 HORAS			
Control	5430733	1285233	24 [†]
Deter.	5214300	642233	12 [†]
48 HORAS			
Control	5036400	1591133 [†]	32 [†]
Deter.	4420966	505933 [†]	11 [†]

* = Deteriorado

† = Diferencias significativas para un $p = 0.05$.

constante en los tres tiempos utilizados.

Con base en los resultados anteriores, se establece que la diferencia en el proceso de la síntesis de proteínas entre la aleurona deteriorada y control, estriba en el efecto que ejerce el AG_9 sobre la síntesis de proteínas, pues es allí donde se observa que ésta es menor en aleuronas deterioradas.

Por otra parte, cuando se analiza el patrón de proteínas sintetizadas en la fluorografía de un gel de SDS de los extractos de las muestras del experimento anterior (Fig. 9), se encuentra que a las 24, 36 y 48 horas en ausencia de AG_9 en aleuronas control y deterioradas, el patrón de proteínas sintetizadas es muy similar. En presencia de AG_9 a las 24 horas de incubación el patrón de proteínas sintetizadas es igual en el deteriorado y en el control. Sin embargo a las 36 y 48 horas en la aleurona deteriorada disminuye notablemente la síntesis de otras proteínas diferentes de α -amilasa, observándose una síntesis preferencial de esta enzima, pues al parecer es más abundante que en el control a los tiempos correspondientes.

Lo anterior se confirma al observar la Abundancia Relativa de α -amilasa (Columna 4, Tabla IV), donde a las 24 horas esta incorporación es semejante en aleuronas control y deterioradas, mientras que a las 36 y 48 horas es mayor en las segundas.

Al calcular la cantidad relativa de α -amilasa sintetizada por 20 aleuronas (Columna 5, Tabla IV), se observa que, en presencia de AG_9 ésta tiende a ser constante en aleuronas controles en función del tiempo; por su parte en aleuronas deterioradas, este parámetro parece incrementarse conforme transcurre el tiempo.

Los resultados arriba mencionados apuntan hacia que, si bien la síntesis de otras proteínas diferentes de la α -amilasa se halla disminuida en la aleurona deteriorada, la de la α -amilasa no disminuye sino que parece aumentarse y su síntesis aparece como primordial sobre la de otras proteínas en presencia de AG_9 .

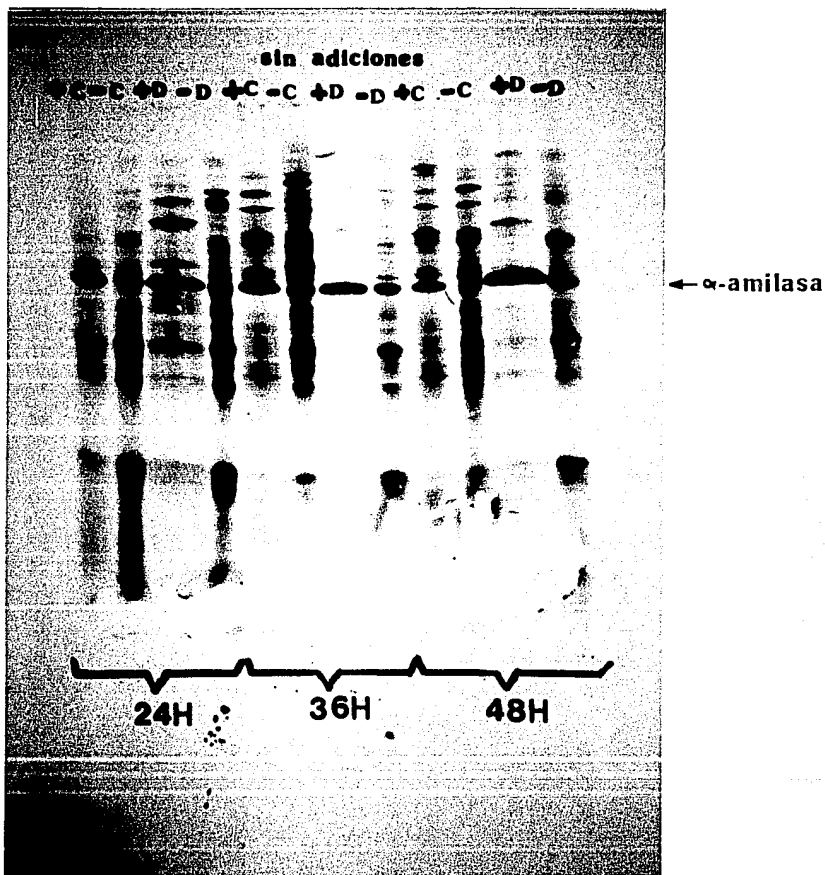


FIG. 9. FLUOROGRAFIA DE UN GEL DE ACRILAMIDA DE SDS. Se colocaron 50000 cpm de extractos de aleuronas control y deterioradas inducidas con y sin $1 \times 10^{-5}M$ de AG_3 por 24, 36 y 48 horas en un gel de acrilamida con SDS, al término de la corrida el gel se procesó como se indica en Materiales y Métodos para la realización de una fluorografía.

TABLA IV. DETERMINACION DE LA INCORPORACION RELATIVA DE RADIOACTIVIDAD A α -AMILASA POR ml. POR 20 ALEURONAS. Se midió el área relativa de las bandas de α -amilasa mediante un rastreador y se determinó la cantidad relativa de α -amilasa sintetizada/ 20 aleuronas (C.R.) ($\text{cpm} \times \% \text{de Area} / \text{ml}$) mediante el siguiente cálculo:

$50000 \text{ cpm} \times \text{Area Relativa}(\% \text{ de Area}) / 100 \times \text{Vol. de muestra aplicado (ml)}$

Tanto para aleuronas control como deterioradas en presencia de AGa.

Tejido	Tiempo de incubación (horas)	C.AI [↔]	Abundancia Relativa de α -amilasa (% de Area)	C.R. ($\text{cpm} \times \% \text{ Area} / \text{ml}$) $\times 10^4$
Control	24	0.74	29.3	39.3
Deteriorado	24	1.64	26.4	16.1
Control	36	0.58	14.4	24.1
Deteriorado	36	1.0	79.8	79.8
Control	48	0.46	11.7	25.4
Deteriorado	48	1.24	50.5	40.8

↔ Cantidad de tejido de aleurona aplicada al gel (Número de aleuronas).

g) Cuantificación de la síntesis de α -amilasa.

Con objeto de determinar la cantidad de α -amilasa sintetizada en aleuronas control y deterioradas, se inmunoprecipitaron extractos de las muestras obtenidas en el experimento de la Fig. 9. Para ello se tomaron 60 μ g de proteína de los extractos obtenidos de las distintas incubaciones de las aleuronas control y deterioradas en presencia de ^{35}S -metionina por 24, 36 y 48 horas con Ag_3 y se les agregó anticuerpo anti- α -amilasa a una dilución 1:10 determinada previamente como la óptima.

En la Figura 10, donde se muestra la fluorografía de un gel de SDS de las muestras obtenidas de este experimento, se observa que la cantidad de péptido sintetizado en aleuronas control parece ser constante a los tres tiempos medidos. En cambio, en la aleurona deteriorada a las 24 horas, la cantidad de α -amilasa sintetizada parece ser similar a la producida en el control, mientras que a las 48 horas se incrementa sensiblemente, siendo aún mayor a la sintetizada en el control a cualesquiera de los tres tiempos de inducción.

Al medir las diferencias en la densidad de las bandas en la fluorografía, los resultados de esta determinación se muestran en la Tabla V, donde se observa que en aleuronas control la síntesis del péptido de α -amilasa se incrementa 1.8 veces a las 48 horas con respecto a las 24 (Columna 5). En aleuronas deterioradas, a las 48 horas se incrementa 3 veces la síntesis de α -amilasa en relación con las 24, la cantidad de este péptido sintetizada a las 24 y 48 horas es mayor en aleuronas deterioradas que en las control.

Los resultados encontrados (Tabla II, III, IV y V), significan que la síntesis de proteínas inducida con Ag_3 en tejido deteriorado, esta disminuida. Esta disminución afecta en forma preferencial a las proteínas diferentes de α -amilasa ya que a las 36 y 48 horas es mayor la abundancia relativa de α -amilasa en las aleuronas deterioradas que en las aleuronas control.

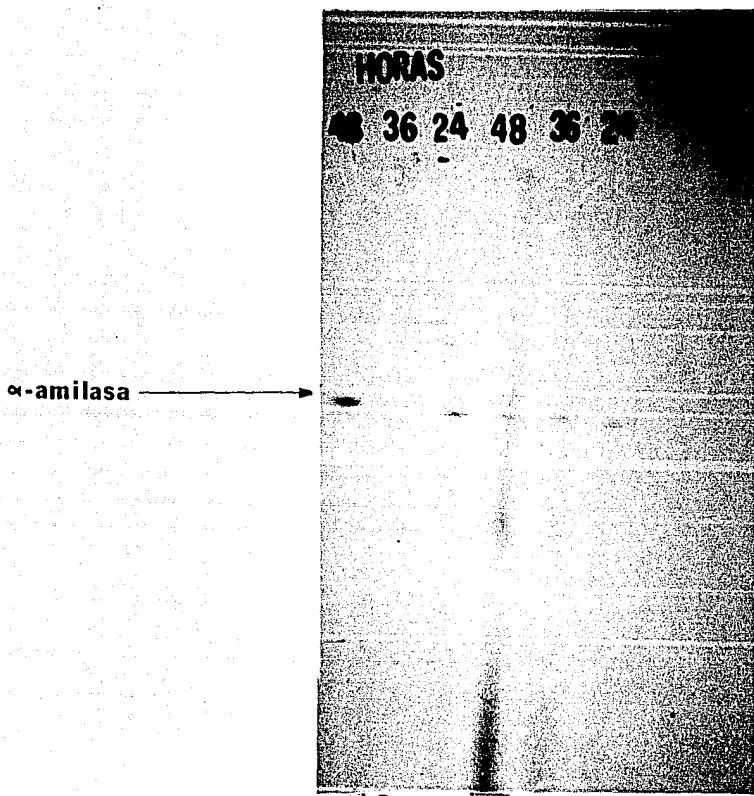


FIG. 10. FLUOROGRAFIA DE UN GEL DE SDS CON MUESTRAS INMUNOPRECIPITADAS. Las muestras utilizadas en el experimento anterior fueron incubadas con anticuerpo anti-alfa amilasa a una dilución 1:10 en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos, colóccandose en el gel el extracto precipitado, al término de la corrida el gel se procesó para la realización de la fluorografía. A la izquierda muestras Deterioradas, a la derecha Controles.

TABLA V. COMPARACION DE LA SINTESIS DE α -AMILASA POR ALEURONAS CONTROL Y DETERIORADAS. Se determinó el área de las bandas de α -amilasa marcadas con ^{35}S -Metionina inmunoprecipitadas mediante un rastreador, para todos los carriles del gel se colocó la misma cantidad de proteína (60 μg).

<i>Tejido</i>	<i>Tiempo de incubación (horas)</i>	<i>C. Al.[↔]</i>	<i>c.p.m.</i>	<i>Area Relativa (% Area)*</i>
Control	24	1.98	13260	271.1
Deteriorado	24	1.9	57950	567.6
Control	48	4.28	41491	484.5
Deteriorado	48	4.28	171135	1735.4

↔= Cantidad de tejido de aleurona agregada (Número de aleuronas).

*= $\times 10^{-4}$

APENDICE.

Medición de la estabilidad del péptido de α -amilasa sintetizado.

La menor estabilidad del péptido de α -amilasa podría ser una de las causas por las cuales se observa una mayor síntesis de α -amilasa en aleuronas deterioradas, por lo que con el propósito de observar si esta propiedad de la enzima era diferente en la aleurona control y deteriorada se determinó en forma preliminar su estabilidad, cuantificando la desaparición de α -amilasa radioactiva en un determinado lapso.

En la Tabla VI (Columna 2) se observa que en un pulso de 3 horas, la síntesis de proteínas es mayor en aleuronas control que en las deterioradas (Columna 4), la cual es similar a lo observado en el experimento de la Tabla III.

Durante el lavado las aleuronas controles pierden el 36% de la radioactividad captada, mientras que las deterioradas pierden el 82%. No obstante, la síntesis de proteínas (radioactividad incorporada a proteína precipitable por TCA, columna 3) es similar a la medida a las 36 Horas tanto para el control como para el deteriorado, lo que sugiere que la estabilidad de las proteínas sintetizadas es semejante en aleuronas control y deterioradas.

La proteína secretada en aleuronas deterioradas (Columna 3) representa el 23% del total sintetizado mientras que en el control constituye sólo el 4.3%.

En general, el patrón de las proteínas sintetizadas (Fig. 11) en tejido control incubado por 36 ó 48 horas es similar, siendo diferente la intensidad de las bandas aun cuando se colocó igual número de cpm, esto podría ser resultado de que péptidos que se precipitan por TCA en papeles filtro salgan del gel al someterse éste a una electroforésis, lo cual sugeriría que existe degradación de proteínas. En aleuronas deterioradas a las 36 y 40 horas, cualitativamente el patrón de proteínas sintetizadas es semejante al de las control. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en el tejido control, a las 40 horas la intensidad de las

TABLA VI.

DETERMINACION DE LA CANTIDAD RECUPERADA DE UN PULSO APLICADO DE ³⁵S-METIONINA.

SE INCUBARON 20 ALEURONAS CONTROL Y DETERIORADAS EN EL MEDIO Y EN LAS CONDICIONES ANTES DESCRITAS EN PRESENCIA DE AG₉ POR 35 HORAS. FINALIZADO ESTE TIEMPO SE AGREGÓ MEDIO FRESCO Y 90 µCl DE ³⁵S-METIONINA, INCUBÁNDOSE LOS TEJIDOS POR UNA HORA MÁS, AL CABO DE LA CUAL SE HOMOGENIZARON LAS ALEURONAS DE UN MATRAZ Y LAS DE OTRO MATRAZ SE LAVARON Y SE INCUBARON CON MEDIO FRESCO POR 4 HORAS, AL TÉRMINO DE LAS CUALES SE HOMOGENIZARON LOS TEJIDOS COLECTÁNDOSE TAMBIÉN EL SOBRENADANTE . SE DETERMINARON LOS PARÁMETROS ABAJO DESCRITOS TANTO EN LOS TEJIDOS COMO EN EL SOBRENADANTE COLECTADO.

<i>Tejido</i>	<i>Captación (cpm)</i>	<i>cpm* precipitables por TCA</i>	<i>% de incor- poración a proteína</i>
Control (35h)	35171	10804	31
Deter.* (35h)	52144	5119	10
Control (40h)	22538	8483	38
Deter (40h)	9453	4016	42
Control (sn) [#] (40 h)	1204	386	32
Deter. (sn) (40 h)	5597	1190	21

*cpm X 10²

*= Deteriorado

#= Sobrenadante

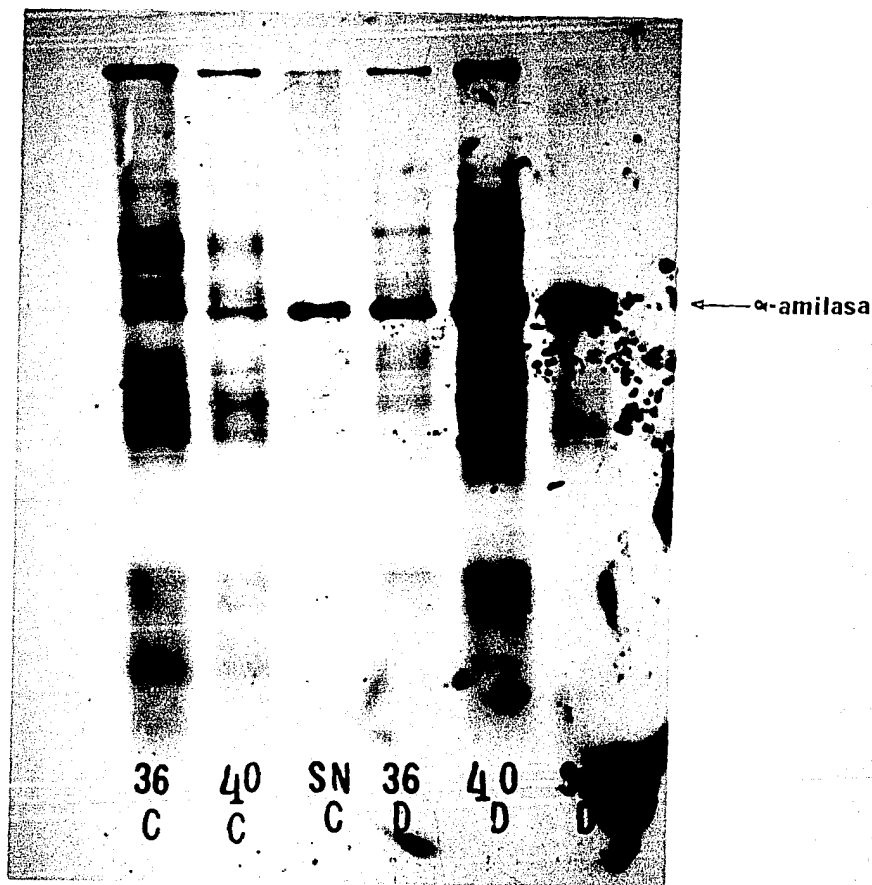


FIG. 11. FLUOROGRAFIA DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION PARA DETERMINAR LA ESTABILIDAD DEL PEPTIDO DE ALFA-AMILASA EN ALEURONAS CONTROL Y DETERIORADAS. Se incubaron aleuronas control y deterioradas en las condiciones antes referidas en la Tabla V, se procesó un matraz a las 36 horas y en otro sólo se lavaron con medio fresco incubándose por 4 horas más con medio fresco. Al término de este tiempo, se procesaron las aleuronas y el sobrenadante, colocándose estas muestras en un gel de acrilamida con SDS que se trató para la realización de una fluorografía.

TABLA VII. DETERMINACION DE LA INCORPORACION RELATIVA DE RADIOACTIVIDAD A α -AMILASA POR 20 ALEURONAS. Se determinó el área relativa de las bandas de α -amilasa de la Fig. 11 mediante un rastreador y se realizó el siguiente cálculo:

$25000 \text{ cpm} \times \text{Area Relativa (\%)} / 100 \times \text{Vol. aplicado (ml)}$
 (C.R.) (cpm \times % Area/ ml), tanto para aleuronas control como deterioradas en presencia de AGs, del experimento de recuperación de un pulso de radioactividad.

Tejido	Tiempo de incubación (horas).	C.AI [↔]	Abundancia Relativa de α -amilasa (% de Area)	C.R. (cpm \times % de Area/ ml) $\times 10^4$
Control	36	0.58	8.9	7.63
Control	40	0.46	18.6	20.2
Control	40	12.9	53.2	2
(sobrenadante)				
Deterior [#]	36	0.66	49.5	37.5
Deterior	40	1.24	31.2	12.5
Deterior	40	4.2	64.3	7.6
(sobrenadante)				

↔= Cantidad de aleurona (Número de aleuronas).

#= Deteriorado.

bandas de proteínas es mayor que a las 36 horas en el tejido deteriorado.

Al determinar la Abundancia relativa de α -amilasa (Tabla VII) se observó que en el control aumenta 2 veces a las 40 horas con respecto a las 36, probablemente porque otras proteínas distintas de α -amilasa se degradan (Fig. 11) o bien porque se aumenta la vida media de la α -amilasa. En aleuronas deterioradas la Abundancia relativa de α -amilasa permanece constante, sin embargo aumenta la síntesis de otras proteínas (Fig. 11).

Estos datos preliminares indican que la Abundancia relativa de α -amilasa permanece constante entre las 36 y 40 horas en aleuronas deterioradas, porque posiblemente aumenta la vida media de otras proteínas distintas a esta enzima, en aleuronas controles la Abundancia relativa de α -amilasa aumenta en este mismo lapso de tiempo, sugiriendo que la vida media de la α -amilasa es mayor en comparación con la de otras proteínas sintetizadas.

Efecto de glucosa sobre la capacidad de acidificación de aleuronas control y deterioradas.

Observaciones efectuadas por Hamabata y colaboradores (46), acerca de que al agregar glucosa al medio de incubación de aleuronas de alto vigor, el proceso de acidificación se reiniciaba aún después de haber llegado a un *plateau* de acidificación. Por ello se decidió probar el efecto de glucosa sobre la capacidad de acidificación de aleuronas deterioradas, con miras a tratar de normalizar esta capacidad en estos tejidos.

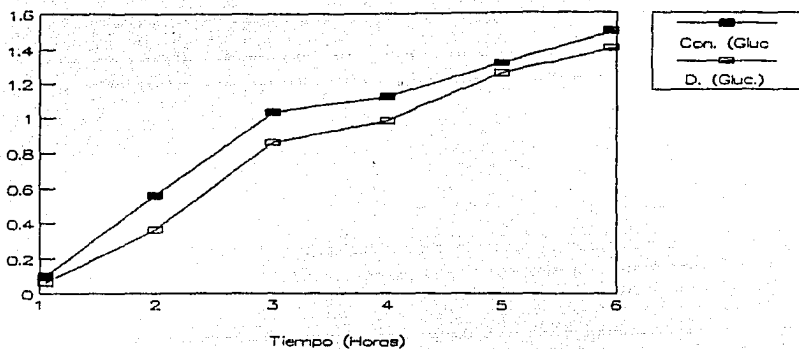
Para ello se incubaron 20 aleuronas en agua desionizada con y sin 50 mM de glucosa, con agitación, por los tiempos indicados. En la Fig. 12, donde se muestran los datos obtenidos en experimentos preliminares, se observa que en el control a las 6 horas no existe una diferencia significativa entre la incubación de las aleuronas en presencia de glucosa y en ausencia de la misma; sin embargo en aleuronas deterioradas sí existe una mayor diferencia entre la acidificación producida en presencia y en ausencia de glucosa, siendo ésta de 0.2 unidades de pH.

Este incremento en la capacidad de acidificación producido por la glucosa en aleuronas deterioradas, sin embargo no lo es tanto para llegar a igualarse a aleuronas control. Posteriormente se repetirán estos experimentos, para comprobar la posible reversión observada de los efectos del deterioro sobre la capacidad de acidificación de las aleuronas.

A la luz de estos datos, se decidió observar el efecto de la glucosa sobre la capacidad de síntesis de proteínas en aleuronas control y deterioradas, efectuándose de la manera ya mencionada anteriormente.

En la Fig. 13, se puede vislumbrar que a las 24 horas no existe ninguna diferencia apreciable en el patrón de proteínas sintetizadas entre el control y el deteriorado, en presencia de AGa. A las 36 horas, se puede ver que se presenta un incremento en el número de proteínas diferentes de α -amilasa sintetizadas en aleuronas deterioradas, en comparación con el obtenido en la figura 9, donde se sintetiza casi exclusivamente α -amilasa, por lo tanto no existe una diferencia apreciable entre el control y el

pH



pH

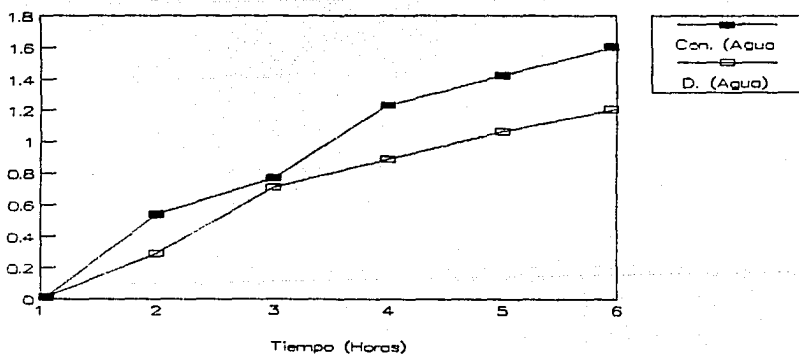


FIG. 12. CINÉTICA DE ACIDIFICACIÓN DE ALBUMINAS CONTROL Y DETERIORADAS EN PRESENCIA DE 50 mM DE GLUCOSA. 20 albuminas control y deterioradas se incubaron en matraces de 50 ml. en 5 ml. de agua desionizada, con y sin 50 mM de glucosa, al término de los tiempos indicados se determinó el pH del medio de incubación.

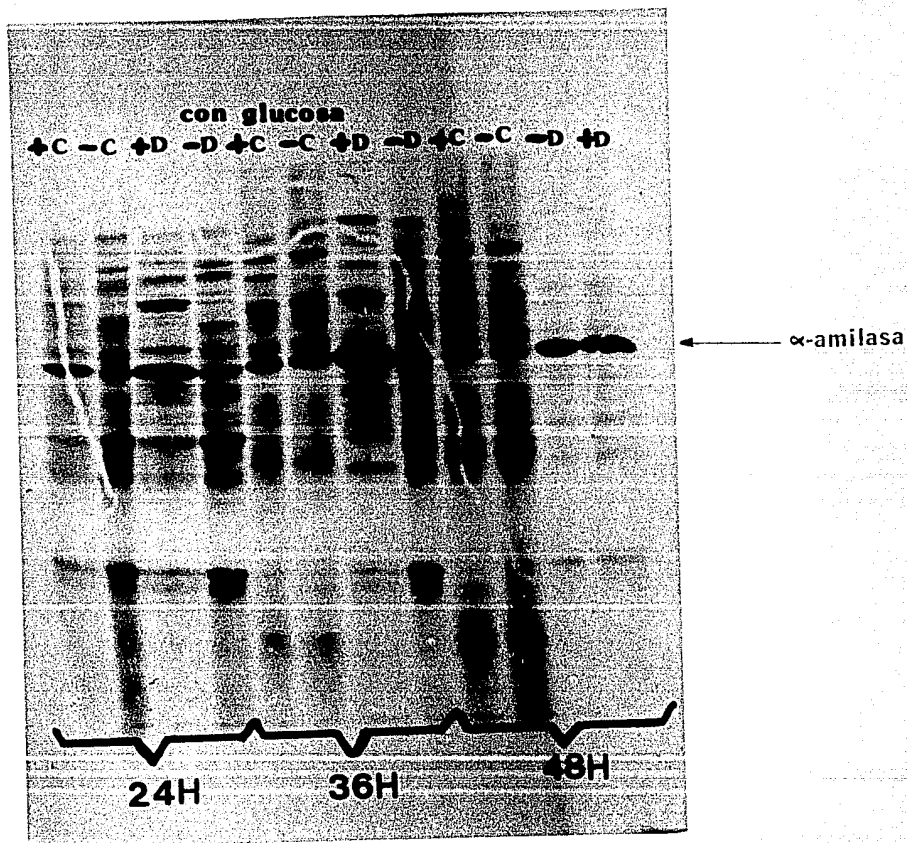


FIG. 13. FLUOROGRAFIA DE UN GEL DE SDS. Se colocaron 50000 cpm de extractos de aleuronas control y deterioradas incubadas en presencia de 50 mM de glucosa y con y sin 1×10^{-5} M de AG_3 por 24, 36 y 48 horas, al termino del tiempo de corrida el gel se procesó como se indica en Materiales y Métodos, para la realización de una fluorografía.

deteriorado en presencia de AGs y de glucosa.

Por el contrario, a las 48 horas en la aleurona deteriorada, se presenta un patrón de proteínas sintetizadas semejante a el que se muestra en la figura 9, en el que se disminuye la síntesis de otras proteínas diferentes de α -amilasa, y se aumenta la síntesis del péptido de esta enzima, presentándose ya una diferencia apreciable entre el control y el deteriorado en este tiempo y en presencia y ausencia de glucosa.

Por lo que toca a lo encontrado en ausencia de AGs y en presencia de glucosa, no se observa ninguna diferencia en el patrón de proteínas sintetizadas entre aleuronas control y deterioradas.

Estos resultados preliminares apuntan hacia que la menor capacidad de acidificación de aleuronas deterioradas, puede ser consecuencia de una falta de sustratos utilizables como fuente de energía, ya que al agregarse glucosa aumenta la acidificación producida por aleuronas deterioradas. Este efecto, no parecería ser por la presión osmótica que se tiene en presencia de 50 mM de glucosa, pues se utilizó sacarosa 50 mM y no se obtuvo el mismo resultado.

Lo anterior podría reflejarse en el hecho de que en presencia de glucosa, se incrementa el número de proteínas sintetizadas diferentes de α -amilasa a las 36 horas en aleuronas deterioradas. A las 48 horas, no se obtendría el mismo resultado, debido probablemente a que la glucosa adicionada a este tiempo ya se habría agotado.

DISCUSION

Las condiciones diferentes de almacenamiento de los dos lotes de semillas de trigo, el lote 1 almacenado a 4 °C y el lote 2 almacenado a temperatura ambiente y sometido a los cambios de humedad y temperatura del ambiente, definitivamente ocasionaron en este último una disminución en el vigor de las semillas, como se verifica en las características fisiológicas presentadas por los dos lotes de semillas utilizadas en este trabajo. Estas características indican que las diferencias entre los dos lotes se localizan en los eventos que dependen del funcionamiento del endospermo almidonoso, mientras que los que dependen del embrión de la semilla son similares en el Lote 1 y 2.

La viabilidad y la velocidad de acumulación de peso seco son producto del metabolismo del embrión de la semilla, y ambos, presentaron una magnitud semejante en el Lote 1 y en el Lote 2 (Fig. 1 y 2a, respectivamente).

Los eventos que se encontraron con magnitudes distintas y que tienen en común el ser determinados por la actividad metabólica de la capa de aleurona, son la velocidad de germinación, la velocidad de movilización de reservas, la capacidad de acidificación y la producción de la actividad de α -amilasa.

La velocidad de germinación se halla regulada por el funcionamiento de la capa de aleurona (1) y se encontró que ésta es menor en el Lote 2 que en el Lote 1 (Fig. 1). La velocidad de movilización de reservas se produce gracias al funcionamiento de la aleurona, ya que este fenómeno acontece mediante la acción de hidrolasas secretadas por esta estructura sobre las macromoléculas almacenadas en el endospermo. Los monómeros, producto de esta hidrólisis, son transportados hacia el embrión, el cual los utiliza para su crecimiento y desarrollo (ver Introducción, Movilización de las reservas del endospermo). La velocidad de movilización de reservas del Lote 2 también se encontró 2 veces disminuida con respecto a la presentada por el Lote 1 (Fig. 2a). Algo similar sucede con la capacidad de acidificación de las aleuronas provenientes de semillas del Lote 2, la cual es menor en comparación con la producida por aleuronas del Lote 1 (Fig. 3). La producción de la actividad de α -amilasa de aleuronas del Lote 2

también sufre un decremento con respecto a la producida por el Lote 1 (Tabla I).

Estos resultados muestran que el almacenamiento a 25 °C de las semillas del lote 2 altera el funcionamiento de la capa de aleurona de estas semillas.

La menor capacidad de acidificación de la aleurona deteriorada, podría contribuir a la disminución de la actividad de α -amilasa, ya que se ha postulado (48) que la acidificación producida por la capa de aleurona modula la acción del AG₃ en la síntesis de α -amilasa, sin embargo el mecanismo preciso se desconoce. Además, también se ha reportado que la acidificación podría contribuir a la solubilización del ión Ca⁺⁺ ya sea el unido a la pared celular de la aleurona (11) y/o el que se encuentra en el endospermo almidonoso (20). Puesto que el mayor reservorio de este ión en semillas de avena (61) y de trigo (56) es la aleurona, la menor capacidad de acidificación de las aleuronas deterioradas podría traer como consecuencia una alteración en la acción del AG₃ y/o una menor disponibilidad de Ca⁺⁺ en el citoplasma de la aleurona, para la síntesis de la α -amilasa la cual requiere un ión Calcio para su integridad estructural (7). Todo esto en conjunto probablemente ocasionaría una menor producción de α -amilasa.

La actividad de α -amilasa producida por aleuronas deterioradas fue menor que la producida por las control (Tabla I), aún cuando la concentración de AG₃ utilizada en la inducción de esta actividad fue igual en ambos casos. La menor actividad de esta enzima también se detectó durante la germinación de semillas deterioradas (59) ó en medias semillas deterioradas incubadas con AG₃ (1).

Lo anterior demuestra que la baja producción de α -amilasa encontrada en aleuronas aisladas de semillas deterioradas no se debe a la carencia de factores del embrión ó del endospermo *i. e.* AG₃, sino probablemente a una alteración en la producción de la actividad de α -amilasa ó a una sensibilidad alterada de las aleuronas deterioradas al AG₃ ó a ambas. Por otra parte, parece que el medio ácido requerido para una acción óptima del AG₃ no se alcanzó en aleuronas deterioradas, aun cuando se proporcionó exógenamente, puesto que la inducción de la actividad de α -amilasa se efectuó a pH 4.0.

Por ello, probablemente el pH exógeno no realiza las mismas

funciones que la acidificación producida por la aleurona ó bien existe otro factor además de la acidificación del medio que limita la producción de la actividad de α -amilasa.

Este factor podría ser la diferente sensibilidad de las aleuronas deterioradas al AG₃ con respecto a la de las control. Este no fue el caso a las 24 horas de incubación de aleuronas control y deterioradas (Fig. 4), puesto que las constantes aparentes de disociación (K_s app) no son significativamente diferentes. El número de Hill obtenido para los dos casos indica la presencia de dos receptores con diferentes afinidad por el AG₃, lo cual concordaría con lo reportado en la literatura acerca de la existencia de un receptor membranal y otro citosólico (62,23), ó bien puede ser producto de la existencia de un receptor con dos sitios de unión a AG₃, siendo esta de cooperatividad negativa. Sin embargo, la respuesta (actividad de α -amilasa) sí es diferente en las dos clases de aleuronas, siendo significativamente menor para las deterioradas. Esto indica que en aleuronas deterioradas en algún paso de la producción de la actividad de α -amilasa existe una limitación ó una alteración, y que muy posiblemente no sea la causa, una diferente afinidad por el AG₃ de estas aleuronas.

Las curvas resultantes de la incubación de aleuronas control y de aleuronas deterioradas con diferentes concentraciones de AG₃ por 48 horas no se ajustaron al modelo de Hill, posiblemente porque a este tiempo de incubación la actividad de α -amilasa determinada es producto de la vida media del péptido secretado de α -amilasa y de la producción de la actividad de esta enzima; el primer fenómeno es independiente de la acción de AG₃. A las 24 horas, la actividad de α -amilasa medida es producida primordialmente por péptidos de α -amilasa sintetizados recientemente, y como ya se ha mencionado (Ver Introducción, Regulación de la síntesis de α -amilasa por AG₃) esta síntesis es regulada por AG₃.

No obstante, de las curvas obtenidas a las 48 horas de incubación es posible deducir que probablemente a este tiempo aumente la afinidad tanto del tejido control como del deteriorado por el AG₃, puesto que parece requerirse una menor concentración de este fitorregulador para producir una máxima actividad de α -amilasa, en comparación con las 24 horas.

Lo anterior puede ser producto de que los factores necesarios para

llevar a cabo esta función, como la síntesis de ARNm de esta enzima ó la acumulación de calcio se realizaron a tiempos anteriores, requiriéndose entonces menor cantidad de AGs para mantener la síntesis de esta enzima.

Existen dos líneas de evidencias que apoyan lo anterior: la concentración de AGs requerida para transcribir el ARNm de α -amilasa es de 20 a 50 veces mayor que la requerida para su traducción (42), además de que se ha reportado que los ARNm de α -amilasa presentan una cinética de acumulación tanto en trigo como en cebada (ver Introducción, Regulación de la síntesis de α -amilasa por AGs.). El de las isoenzimas de Bajo p.I. disminuye a las 96 horas (37) en medias semillas de trigo y en aleuronas de cebada a las 40 horas (42), el de las isoenzimas de Alto p.I. en medias semillas de trigo desaparece a las 48 horas de incubación (37), y en aleuronas de cebada (42), declina a las 36 horas de incubación.

Por lo tanto, después de las 40 horas de incubación en nuestro caso, probablemente o ya no se sintetice ARNm de α -amilasa o bien se sintetice primordialmente el ARNm de las isoenzimas de Bajo p.I., proceso que se ha reportado que ó no requiere de AGs o necesita de bajas concentraciones de este fitoregulator (24, 42), dando como resultado un menor requerimiento (mayor afinidad) de las aleuronas control y deterioradas por el AGs a las 48 horas para producir una máxima actividad de α -amilasa.

Las isoenzimas encontradas tanto en aleuronas de trigo control como en las de trigo deteriorado, parecen formar 3 isogrupos mismos que fueron diferentes en el p.I. al reportado en cebada para los dos grupos (Ver Introducción, Isoenzimas de α -amilasa). En el presente trabajo se encontró un grupo cuyo p.I. es de 8.0 a 6.6 siendo más alcalino que el reportado en cebada para las isoenzimas de Alto p.I. (5.9 a 6.6). Sin embargo el patron electroforético de ambos grupos es muy similar lo mismo que el número de isoenzimas del grupo (4 isoenzimas). Asimismo, el grupo de menor p.I. mostró un rango de p.I. más alcalino que el reportado en cebada (5.0 a 5.4 para el primer caso y de 4.6 a 5.2) pero con el mismo número de bandas. Por su parte, el grupo encontrado con p.I. intermedio (5.5 a 6.4) con sólo dos isoenzimas correspondería al grupo de Alto p.I. de cebada por los

p.I. presentados.

Tanto el patrón electroforético como el número de isoenzimas de los grupos encontrados en este trabajo, concuerdan con el reportado por Sargeant (54) para semillas de trigo con 7 días de germinación, donde las isoenzimas de p.I. intermedio del presente trabajo se encuentran dentro del grupo de Alto p.I. reportado por este autor y los grupos de Bajo p.I. son similares en ambos casos. Igualmente, Conford y colaboradores (13) reportan en embriones de semillas de trigo, el grupo encontrado en este trabajo como de p.I. intermedio, dentro del grupo de Alto p.I. y que estas dos isoenzimas se comportan de forma distinta al resto de las isoenzimas del grupo. Las isoenzimas del grupo de Bajo p.I. son semejantes en los dos casos.

Así, el patrón de isoenzimas encontrado en el presente trabajo coincide con el que presentan las semillas de trigo después de la germinación y con el de embriones de trigo incubados con AGa. No obstante, los p.I. del grupo de Alto p.I. en el presente trabajo son más alcalinos debido posiblemente al método de medición de pH utilizado, puesto que otros autores utilizan un electrodo de superficie mientras que, en nuestro caso se utilizó un electrodo de inmersión. Para fines de discusión se considerará que sólo hay dos isogrupos: el de Alto p.I. que en este trabajo será de 8.0 a 5.9 con 6 bandas y el de Bajo p.I., cuyo rango de p.I. es de 5.0 a 5.4, formado por 6 bandas.

La cinética de aparición de las isoenzimas en aleuronas aisladas de semillas control (Fig. 5), contrasta con lo reportado para aleuronas de cebada y de trigo. En el primer caso aparecen primero las de Bajo p.I. (49, 42) mientras que en el segundo caso lo hacen las de Alto p.I. (37). En aleuronas control, aparecen simultáneamente a las 24 horas de inducción (Fig. 5) las isoenzimas del grupo de Bajo p.I. y dos del grupo de Alto p.I.. A las 36 horas de tratamiento ambos isogrupos están presentes con sus bandas completas, mientras que a las 48 horas de incubación existe una ligera disminución en la actividad de las isoenzimas de Bajo p.I. (Fig. 5). Otra diferencia encontrada en aleuronas de trigo control, es el hecho de que la mayor contribución a la actividad enzimática total la realizan las isoenzimas de Bajo p.I. y 2 de Alto p.I., mientras que en cebada la mayor contribución la

hacen las de Alto p.I. (42).

La cinética de aparición de la actividad de las isoenzimas deterioradas, aparentemente es similar a la de las controles. Fese a ello, la actividad de los dos grupos está disminuida por igual en comparación con la de las isoenzimas controles. A las 48 horas se observa como en el control, que las isoenzimas que más contribuyen a la actividad enzimática total son las dos de Alto p.I. y las de Bajo p.I..

Lo anterior indica que el deterioro no afecta la expresión de un grupo de isoenzimas en particular, ya que la actividad de los 2 grupos se encuentra disminuida de la misma forma, implicando que la alteración en la producción de la actividad de α -amilasa está en un paso común para los 2 grupos.

La síntesis de proteínas es un paso común para la producción de la actividad de los 2 grupos de isoenzimas; se ha reportado que en embriones aislados de semillas de bajo vigor (52), se presenta una disminución en la capacidad de síntesis de proteínas de esta estructura. Lo mismo sucede en aleuronas sometidas a un *shock* de alta temperatura (57), por lo que en aleuronas deterioradas ésta podría ser la causa de la menor actividad de α -amilasa pues se sintetizaría menos péptido de esta enzima en las aleuronas deterioradas que en las controles.

Los resultados obtenidos muestran que este no es el caso, pues la capacidad de síntesis de proteínas de las dos clases de aleuronas es similar (Tabla II). La diferencia encontrada en esta función entre las dos clases de tejidos estriba en el efecto que sobre ésta ejerce el AG3 (Tabla III), pues mientras en aleuronas controles este fitorregulador incrementa la capacidad de síntesis de proteínas en función del tiempo, en aleuronas deterioradas permanece constante, siendo menor la capacidad de síntesis de proteínas de estas aleuronas a las 36 y 48 horas con respecto a la del control (Tabla III).

Asimismo, se encontraron otras diferencias tanto en el patrón de proteínas sintetizadas como en la síntesis de α -amilasa. En aleuronas control la síntesis de esta enzima es similar a los tiempos medidos (Tabla IV, Fig. 10, Tabla V), aumentando probablemente a las 48 horas la síntesis de otras proteínas distintas de esta enzima (Fig. 9). En aleuronas deterioradas se

observa que aumenta la síntesis del péptido de α -amilasa siendo 3.6 veces mayor que la sintetizada en las aleuronas controles a las 48 horas (Tabla V), mientras que se reduce notablemente la síntesis de otras proteínas distintas de α -amilasa, sintetizándose el péptido de esta enzima prioritariamente sobre otras proteínas (Fig. 9).

Una posible explicación a estos últimos resultados, es que exista una degradación de los ARNm diferentes de α -amilasa ya sea presintetizados ó sintetizados *de novo*, ó una menor síntesis *de novo* de este polinucleótido.

A este respecto se ha reportado que en embriones de semillas de bajo vigor existe una disminución en la velocidad de síntesis *de novo* de ARNm (52), conservándose por más tiempo los polinucleótidos preformados. Por lo tanto, éste puede ser el caso en aleuronas deterioradas en presencia de AG₃, ya que después de las 24 horas se encuentra notablemente disminuida la síntesis de proteínas distintas de α -amilasa, cuyos ARNm probablemente se sintetizan *de novo* por acción de AG₃, mientras que la síntesis de esta enzima se incrementa, posiblemente, porque el ARNm de α -amilasa es el más abundante, y por lo tanto, una disminución en la concentración del mismo no sería tan aparente.

Esta probable explicación no excluye la posibilidad de que el AG₃ ejerza un control más estricto sobre la síntesis de ARNm y de proteínas en aleuronas deterioradas en comparación con el ejercido en aleuronas controles, puesto que se encontró que la diferencia en la capacidad de síntesis de proteínas entre los dos tejidos radica en el efecto que el AG₃ ejerce sobre esta función. Se ha reportado que este fitorregulador disminuye la cantidad total de ARN poliadenilado y aumenta la del ARNm de α -amilasa al igual que redirige la síntesis de proteínas en células de aleuronas (27 y 49). Por ende, en aleuronas deterioradas posiblemente se disminuiría la síntesis de ARNm de otras proteínas, incrementándose a su vez la del ARNm de α -amilasa y se traduciría preferentemente este último polinucleótido sobre los demás. El resultado de ello sería un aumento en la síntesis de α -amilasa y una disminución en la síntesis de proteínas diferentes de esta enzima.

Por otro lado, relacionando los resultados encontrados para la

Síntesis de α -amilasa en aleuronas control y deterioradas con los de la actividad observada de esta enzima en estas dos clases de aleuronas, se observa que a pesar de que se sintetice en mayor cantidad el péptido de α -amilasa en aleuronas deterioradas (Tabla V, Fig. 10), se observa una menor actividad de esta enzima tanto a las 24 como a las 48 horas (Tabla I), en comparación con la presentada por aleuronas controles, lo que podría deberse a que el péptido de α -amilasa esté inactivo por no procesarse en forma adecuada.

La mayor marca incorporada a la banda de α -amilasa en aleuronas deterioradas puede ser producto de que se sinteticen en forma predominante las isoenzimas de Bajo p.I. en esta aleurona, ya que se ha reportado que las isoenzimas de Bajo p.I. (24) poseen el doble de residuos de Metionina que las de Alto p.I. Sin embargo, aun cuando se sinteticen primordialmente las isoenzimas de Bajo p.I. a las 48 horas, por la magnitud de la diferencia en la marca incorporada a el péptido de α -amilasa con respecto a la que se incorpora en el control (Tabla IV), implica que posiblemente se sintetice una proporción de péptido de α -amilasa en forma inactiva en aleuronas deterioradas.

La mayor síntesis del péptido de α -amilasa en aleuronas deterioradas podría también ser producto de que éste tuviera una vida media menor en este tejido en comparación con la que presenta en el control. En experimentos preliminares donde se midió la estabilidad del péptido de α -amilasa en aleuronas control y deterioradas, se encontró que ésta es similar en los dos tejidos, pero la secreción de este péptido de las células de aleuronas deterioradas es mayor (Fig. 11, Tabla VI) que en las control y no se observa una acumulación del mismo en el tejido de las aleuronas deterioradas. A este respecto, se ha reportado (57) que la inhibición de la secreción de la α -amilasa inhibe la síntesis de esta enzima, por lo que posiblemente una mayor secreción de α -amilasa pueda estimular su síntesis.

Un modelo de lo que probablemente esté sucediendo en la aleurona deteriorada en torno a la producción de α -amilasa sería el siguiente:

Se sabe primeramente, que la α -amilasa se sintetiza en el retículo endoplásmico y que el Aparato de Golgi interviene en su secreción

(19,39). Asimismo que la α -amilasa es una metaloenzima que si no posee un ión calcio unido al péptido de la enzima, no se forma el sitio activo de la misma (7), por lo cual existe una gran demanda de calcio durante el período de síntesis de α -amilasa que parece satisfacerse mediante la acumulación de este ión en el retículo endoplásmico de las células de aleuronas, esta acumulación se ha observado es estimulada por AG₃ (9).

En células animales y en levaduras, se ha propuesto (53) que el mecanismo de secreción de las proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico por el aparato de Golgi, es regulado por las oscilaciones del ion calcio hacia afuera y hacia adentro del retículo. Si se alteran estas oscilaciones mediante ionóforos o por mutaciones de las proteínas del retículo endoplásmico encargadas de secuestrar calcio, se pierde el control de la secreción de las proteínas sintetizadas ya que o se secretan proteínas cuya función esta dentro del retículo endoplásmico, o se secretan proteínas que no se hallan bien ensambladas o bien cuya síntesis no se ha finalizado.

Parece ser que en aleuronas deterioradas, por una parte, se tiene un efecto de regulación diferente del AG₃ sobre la síntesis de proteínas. Este efecto podría ejercerse desde la síntesis de ARN poliadenilado donde se disminuiría la síntesis de ARNm diferentes del de α -amilasa, o bien desde la síntesis de proteínas sintetizándose casi exclusivamente α -amilasa. Por otra parte, se tiene una mayor cantidad de péptido de esta enzima y una menor actividad enzimática y no parece estar afectada su secreción de células de la aleurona. Esto implica que posiblemente se existe una proporción de péptidos inactivos de α -amilasa que se secretan de igual forma que los activos.

Ya que el control de la secreción de los péptidos sintetizados y ensamblados óptimamente parecen ejercerlo las oscilaciones de calcio, probablemente en aleuronas deterioradas exista una menor acumulación de este ion en el retículo endoplásmico por estar disminuida la movilización del mismo, tanto de la pared celular como del espacio periplásmico de la aleurona hacia el citoplasma, ocasionado esto en parte, probablemente, por una menor acidificación producida por la aleurona deteriorada.

Aunado a lo anterior, la permeabilidad de las membranas de las

aleuronas deterioradas parece ser diferente en comparación con la de las controles, contribuyendo esto último también a la probable menor concentración de Ca^{++} en las primeras. Por lo tanto, en ausencia de suficiente calcio tanto para la síntesis de α -amilasa como para la regulación de la secreción de los péptidos de esta enzima, posiblemente se estén produciendo péptidos mal procesados y en consecuencia inactivos, mismos que se secretan al igual que los procesados óptimamente por haberse perdido el control de la regulación de la secreción de las proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico.

Otra posible causa de que el péptido de α -amilasa este inactivo, es que no se formen los puentes disulfuro que contiene la enzima, por lo que su configuración va a ser diferente ocasionando así una pérdida de la actividad de la enzima.

Por otra lado, la razón de que se acidifique en menor proporción en aleuronas deterioradas, parece ser que es la falta de energía ya que en experimentos preliminares incubando las aleuronas con glucosa 50 mM, se observó que esta acidificación se normaliza. Por ello, probablemente normalizando esta función sea posible revertir algunos de los efectos encontrados del deterioro sobre el funcionamiento de la aleurona de trigo, ya que se observa que en presencia de glucosa a las 36 horas, ya se sintetizan otras proteínas diferentes de α -amilasa en aleuronas deterioradas (Fig. 12).

En suma, los resultados encontrados en este trabajo indican que, aun cuando se almacenen las semillas en condiciones ambientales no extremas y que las alteraciones observadas en los parámetros fisiológicos sean de pequeña magnitud, existen alteraciones importantes en los procesos bioquímicos de la capa de aleurona, como se observó que ocurría en la producción de la actividad de α -amilasa, enzima importante en la movilización de reservas del endospermo almidonoso, ocasionando una disminución en la probabilidad de que la plántula se establezca eficientemente en el campo.

Por todo ello, la actividad de α -amilasa presentada por semillas de cereales podría ser un candidato a indicador de deterioro en estas semillas.

CONCLUSIONES

- 1) Las condiciones de deterioro utilizadas en este trabajo disminuyen el vigor de las semillas de trigo, alterando principalmente a la capa de aleurona y no al embrión de la semilla.
- 2) La capacidad de acidificación de aleuronas aisladas de semillas deterioradas se decrementa por efecto del deterioro.
- 3) La actividad de α -amilasa producida por aleuronas deterioradas es menor a la producida por aleuronas control.
- 4) La sensibilidad de aleuronas deterioradas a el AG₃ no parece ser diferente a la de aleuronas controles, sin embargo, la respuesta a este fitorregulador medida a través de la actividad de α -amilasa, es menor en aleuronas deterioradas.
- 5) El patrón de isoenzimas en aleuronas deterioradas y controles es semejante, a excepción de que en aleuronas deterioradas no se observa la actividad de una de las isoenzimas de Alto p.I.. La actividad de los dos grupos de isoenzimas se encuentra igualmente disminuida en aleuronas deterioradas..
- 6) La capacidad de síntesis de proteínas de aleuronas deterioradas es similar a la de aleuronas control, pero el efecto que el AG₃ ejerce sobre esta función es diferente.
- 7) La cantidad de péptido sintetizado de α -amilasa en aleuronas deterioradas es mayor a la cantidad sintetizada en aleuronas controles.
- 8) La menor actividad de α -amilasa producida por aleuronas deterioradas, probablemente se deba a una distinta regulación del AG₃ sobre la síntesis de proteínas de la aleurona deteriorada y/o a una limitación en la producción de la actividad de α -amilasa, probablemente en el procesamiento del péptido sintetizado.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aspinall, D., Paleg, L.G. (1971) The Deterioration of Wheat Embryo and Endosperm Function with Age. *J.Exptl.Botany.* 22 (73), 925-935.
- 2.- Baulcombe, D.C., Buffard, D. (1983) Gibberellic-acid-regulated expression of α -amylase and six other genes in wheat aleurone layers. *Planta.* 157, 493-501.
- 3.- Bewley, J.D., Black, M. (1985) "Seeds Physiology of Development and Germination". Plenum Press, N.Y. pp. 253-300.
- 4.- Bird, R., Hopkins, R.H. (1954) *Biochem. J.* 56, 86.
- 5.- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- 6.- Bray, C.M. en "Recent Advances in the Biochemistry of Cereals". "Nucleic Acid and Protein Synthesis in the Embryo of Germinating Cereals". (1979) Edited by Laidman, D.L., Jones, R.G.W. Academic Press. London. pp. 147-173.
- 7.- Buisson, G., Duée, E., Haser, R., Payan, F. (1987) Three dimensional structure of porcine pancreatic α -amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *EMBO J.* 113 (6), 3909-3916.
- 8.- Bush, D.S., Cornejo, M.J., Huang, C.N., Jones, R.L. (1986) Ca^{++} -Stimulated Secretion of α -Amylase During Development in Barley Aleurone Protoplasts. *Plant Physiol.* 82, 566-574.
- 9.- Bush, D.S., Biswas, A.K., Jones, R.L. (1989) Gibberellic-acid-stimulated Ca^{2+} accumulation in endoplasmic reticulum of barley aleurone: Ca^{2+} transport and steady-state levels. *Planta.* 178, 411-420.
- 10.- Carbonell, J., Jones, R.L. (1984) A comparison of the effects of Ca^{++} and gibberellic acid on enzyme synthesis and secretion in barley aleurone. *Physiol.Plant.* 63, 345-350.
- 11.- Cleland R., E.Sarbjt S.V., Taylor, J.D (1989) Wall Calcium pH and Wall Loosening. Supplement to *Plant Physiol.* 89, 43.
- 12.- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1986) "Molecular Cell Biology". Scientific American Books. USA. pp. 674-676.
- 13.- Cornford, C.A., Black, M., Daussant, J., Murdoch, K. (1987) α -Amylase Production by Pre-Mature Wheat (*Triticum aestivum*

- L.) Embryos. J. Exptl. Bot. 38, (187), 277-285.
- 14.- Devlin, R.M. (1980) "Fisiologia Vegetal". Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. pp. 446-469.
- 15.- Doig, R.I., Colborne, A.J., Morris, G., Laidman, D.L. (1975) The Induction of Glyoxysomal Activities in the Aleurone Cells of Germinating Wheat. J. Exptl. Bot. 26 (92), 387-398.
- 16.- Fernandez, D.E., Staehelin, A.L. (1987) Does Gibberellic Acid Induce the Transfer of Lipase from Protein Bodies to Lipid Bodies in Barley Aleurone Cells? Plant Physiol. 85, 487-496.
- 17.- Fincher, G.B. (1989) Ann.Rev.Plant Physiol. Molecular and Cellular Biology Associated with Endosperm Mobilization in Germinating Cereal Grains. 40: 305-346.
- 18.- Gitlali, D., Swati Sen-Mandi. (1988) Root Formation in Deteriorated (Aged) Wheat Embryos. Plant Physiol. 88, 983-986.
- 19.- Gubler, F., Jacobsen, J.V., Ashford, A.E. (1986) Involment of the Golgi apparatus in the secretion of α -amylase from gibberellin-treated barley aleurone cells. Planta. 168, 447-452.
- 20.- Hamabata, A., García-Maya, M., Romero, T., 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. Plant Physiol. 86, 643-644.
- 21.- Hardie, G.D. (1975) Control of Carbohydrase Formation by Gibberellic Acid in Barley Endosperm. Phytochemistry. 14, 1719-1722.
- 22.- Hooley, R., Beale, M.H., Smith, S.J. (1990) Gibberellin Perception in the *Avena fatua* Aleurone. S.E.B. Symposium.
- 23.- Hooley, R., Beale, M.H., Smith, S.J., MacMillan, J. "Plant Growth Substances". "Novel Affinity Probes for Gibberellin Receptors in Aleurone Protoplasts of *Avena fatua*." (1989) Ed. by Phans, R.P., Rood, S.B. Springer Verlag, Heidelberg.
- 24.- Huttly, A.K., Baulcombe, D.C. (1989) A wheat α -Amy2 promoter is regulated by gibberellin in transformed oat aleurone protoplasts. EMBO J. 8 (7), 1907-1913.
- 25.- Jacobsen, J.V., Bush, D.S., Sticher, L., Jones, R.L. (1988) Evidence for Precursor Forms of the Low Isoelectric Point α -Amylase Isozymes Secreted by Barley Aleurone Cells. 88, 1168-1174.

- 26.- Jacobsen, J.V., Higgins, T.J.V. (1982) Characterization of the α -Amylases Synthesized by Aleurone Layers of Hymalaya Barley in Response to Gibberellic Acid. *Plant Physiol.* 70, 1647-1653.
- 27.- Jacobsen, J.V., Beach, L.R. (1985) Control of transcription of α -amylase and rRNA genes in barley aleurone protoplasts by gibberellin and abscisic acid. *Nature.* 316, 275-277.
- 28.- Jacobsen, J.V., Hanson, A.D., Chandler, P.C. (1986) Water Stress Enhances Expression of an α -Amylase Gene in Barley Leaves. *Plant Physiol.* 80, 350-359.
- 29.- Jones, R.L., Deikman, J., Melroy, D. in "NATO Advanced Research Workshop on Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development" "Role of Ca^{++} in the Regulation of α -Amylase and Secretion in Barley Aleurone". Ed. A.S. Trewavas. Plenum Press, N.Y. pp. 49-56.
- 30.- Khan, A.A. in "The Physiology and biochemistry of seed development dormancy and germination". "Giberellins and seed Development". (Edited by Kahan, A.A.) (1982). Elsevier Biomedical Press, Netherlands. pp. 111-135.35.
- 31.- Keith, B., Boal, R., Srivastava, L.M. (1980) On the Uptake, Metabolism and Retention of 3H Gibberellin A_1 by Barley Layers at Low Temperatures. *Plant Physiol.* 66, 956-961.
- 32.- Keith, B., Foster, N., Bonettemaker, M., Srivastava, L.M. *In vitro* Gibberellin A_1 Binding to Extracts of Cucumber Hypocotyls. (1981) *Plant Physiol.* 68, 344-348.
- 33.- Keith, B., Brown, S., Srivastava, L.M. (1982) *In vitro* binding of gibberellin A_1 to extracts of cucumber measured by using DEAE-cellulose filters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 1515-1519.
- 34.- Khurshheed, B., Rogers, J.C. (1988) Barley α -Amylase Genes. *J. Biol. Chem.* 263 (35), 18953-18960.
- 35.- Laemlli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- 36.- Laidman, D.L. en "The Physiology and Biochemistry of seed development dormancy and germination". "Control Mechanisms in the Mobilization of stored nutrients in germinating cereals". (Edited by Khan, A.A.) (1982). Elsevier Biomedical Press,

- Netherlands, pp. 371-405.
- 37.- Lazarus, C.M., Baulcombe, D.C., Martienssen, R.A. (1985) α -amylase genes of wheat are two multigene families which are differentially expressed. *Plant.Molec.Biol.* 5, 13-24.
 - 38.- Lehninger, A.L. (1978). "Bioquímica". Eds. Omega, España. pp.270-272.
 - 39.- Melroy, D., Jones, R.L. (1986) The effect of monensin on intracellular transport and secretion of α -amylase isoenzymes in barley aleurone. *Planta.* 167, 252-259.
 - 40.- Moore, T.C. (1979) "Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. Springer-Verlag. N.Y. Inc. pp. 60-75.
 - 41.- Moreno, M.E. (1984) Análisis físico y Biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología, UNAM. México. pp. 222-249.
 - 42.- Nolan, R.C., Ho, T.D. (1988) Hormonal Regulation of α -Amylase Expression in Barley Aleurone Layers. *Plant Physiol.* 00, 588-593.
 - 43.- Nolan, R.C., Ho, D.T. (1988) Hormonal regulation of gene expression in barley aleurone layers. *Planta.* 174, 551-560.
 - 44.- Noodén, L.D. en "Senescence and Aging in Plants". "The Phenomena of Senescence and Aging". (Edited by Noodén, L.D. Leopold, A.C.) (1988) Academic Press, N.Y. pp. 2-38.
 - 45.- Du-Lee, T., Turgeon, R., Ray, W. (1988) Interaction of a gibberellin-induced factor with the upstream region of an α -amylase gene in rice aleurone tissue. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 85, 6366-6369.
 - 46.- Priestley, D.A. (1986) Seed Aging. Comstock Publishing Associates. USA. pp. 17-75.
 - 47.- Rodríguez-Campos, E., Hamabata, A., Bernal-Lugo, I. (1988) Acidification caused by aleurone tissue depends upon glycolysis. *Supplement to Plant Physiol.* 86.
 - 48.- Rodríguez-Campos, E., Bernal-Lugo, I., Hamabata, A. (1989) Permissive Role of the Acidification caused by Wheat Aleurone Layers upon α -Amylase Induction by GAs. *Supplement to Plant Physiol.* 89, 169.
 - 49.- Rogers, C.J. (1985) Two Barley α -Amylase Families Are Regulated Differently in Aleurone Cells. *J.Biol.Chem.* 260 (6), 3731-3738.
 - 50.- Rood, S.B., Larsen, K. (1988) Gibberellins, Amylase, and the

Onset of Heterosis in Maize Seedlings. J.Exptl.Botany. 39 (199), 223-233.

- 51.- Rothstein, S.J., Lazarus, C.M., Smith, W.E., Baulcombe, D.C., Gatenby, A.A. (1984) Secretion of a wheat α -amylase expressed in yeast. Nature. 308, 662-664.
- 52.- Rushton, P.J., Bray, C.M. (1987) Stored and de novo synthesised polyadenylated ARN and loss of Vigour and Viability in Wheat Seed. Plant Sci., 51, 51-59.
- 53.- Sambrook, J.F. (1990) The Involment of Calcium in Transport of Secretory Proteins from the Endoplasmic Reticulum. Cell 61, 197-199.
- 54.- Sargeant, J.G. en "Recent Advances in the Biochemistry of Cereals". "The α -Amylase Isoenzymes of Developing and germinating Wheat Grain". (1979). Ed. by Laidman, D.L., Jones, R.G.W. Academic Press. London. pp. 339-343.
- 55.- Serebryakov, E.P., Agnistikova, V.N., Suslova, M.L. (1984) Growth-Promoting activity of some selectively modified Gibberellins. Phytochemistry. 23 (9), 1847-1854.
- 56.- Stewart, A., Hilary, N., Lott, J.N.A. (1988) An Investigation of the Mineral Content of Barley Grains and Seedlings. Plant Physiol. 86, 93-97.
- 57.- Sticher, L., Biswas, A.K., Bush, D.S., Jones, R.L. (1990) Heat Shock Inhibits α -Amylase Synthesis in Barley Aleurone without Inhibiting the Activity of Endoplasmic Reticulum Marker Enzymes. Plant Physiol. 92, 506-513.
- 58.- Svensson, B., Gibson, R.M., Haser, R., Astier, J.P. (1987) Crystallization of Barley Malt α -Amylases and Preliminary X-ray Diffraction Studies of the High pI Isozymes, α -Amylase 2. J.Biol.Chem. 262 (28), 13682-13684.
- 59.- Tiburcio Trejo, L.L. (1985) "Caracterización Bioquímica de la Capa de Aleurona de semillas de Bajo Vigor". Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- 60.- Tkachuk, R., Kruger, J.E. (1974) Wheat α -Amylases. II Physical Characterization. Cereal Chem. 51, 508-529.
- 61.- Tretyn, A., Kopcewicz, J. (1988) Calcium localization in oat aleurone cells using chlorotetracycline and X-ray microanalysis. Planta 175, 237-240.
- 62.- Varner, J.E., Chandra, M.J., Chrispeels, M.J. (1967)

Giberellic acid-controlled synthesis of α -amylase in barley aleurone layers. J.Cell Comp. Physiol. 66: 55-68.

63.- Yalpani, N., Srivastava, L.M. (1985). Competition for *in vitro* ^3H Gibberellin A₄ Binding in Cucumber by Gibberellins and their Derivatives. Plant Physiol. 79, 963-967.

64.- Zwar, J.A., Hooley, R. (1986) Hormonal Regulation of α -Amylase Gene Transcription in Wild Oat (*Avena fatua* L.) Aleurone Protoplasts. Plant Physiol. 80, 459-463.